

FACULTAD DE FARMACIA.
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA I.
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE. MADRID.

ALTERACIONES DE UN ACEITE DE GIRASOL USADO EN FRITURA.
INCIDENCIA DE SU INGESTA SOBRE PARAMETROS NUTRICIONALES Y
DEL METABOLISMO LIPOPROTEICO EN RATAS.

El consejo del Departamento de Nutrición y Bromatología I, informa sobre la tesis doctoral titulada "Alteraciones de un aceite de girasol usado en fritura. Incidencia de su ingesta sobre parámetros nutricionales y del metabolismo lipoproteico en ratas", realizada bajo la dirección de los Doctores Carmen Cuesta Lorenzo y Fco. José Sánchez Muñoz, con la calificación de apto cum laude por unanimidad.

A) ORIGINALIDAD DEL TRABAJO.

355

La originalidad de esta Tesis es estudiar el efecto de un aceite de girasol utilizado repetidas veces en frituras de patatas sobre el metabolismo lipoproteico ya que parece evidente que el aceite de girasol se comporta como hipocolesterolemizante, pero no existen prácticamente datos donde se confirmen que tal efecto se mantiene después de su utilización en frituras.

En la reunión del Grupo Europeo de Nutricionistas (GEN) que tuvo lugar en París en 1975 y en las conclusiones del First International Symposium of Frying of Food, celebrada en Madrid en 1986, se puso de relieve la necesidad de estudiar la relación entre grasas transformadas culinariamente y enfermedades cardiovasculares, indicándose la posibilidad de que gran parte de los datos epidemiológicos basados en la posible relación ingesta/grasa/enfermedades cardiovasculares, podrían carecer de base científica, ya que esta relación se había calculado considerando la ingesta de las grasas crudas.

B) RELEVANCIA DEL TRABAJO DENTRO DE SU AMBITO CIENTIFICO ACTUAL.

En la actualidad existe un amplio debate si una rápida o lenta renovación del aceite de las freidoras con aceite sin usar afectaría negativa o positivamente en el deterioro de la grasa culinaria.

Los datos de esta Tesis confirman que como consecuencia de una renovación frecuente del aceite de la freidora con aceite sin usar el nivel del 25% de material polar (marcado por la Legislación en el que debe desecharse el aceite para su uso en alimentación), probablemente nunca se alcanzaría. Este aspecto da una enorme relevancia a la Tesis dentro del ámbito científico actual y es de una gran importancia tecnológica y económica para las empresas que se dedican a la producción de productos fritos, pues significaría poder obtener un producto frito de mejor calidad.

La utilización de dicho aceite en dietas para ratas incrementó el contenido de colesterol plasmático y el transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL), así como del número de partículas HDL, lo que garantizaría un incremento del transporte de colesterol al hígado para prevenir el incremento de colesterol en suero.

No obstante además de estos efectos teóricamente positivos hay que indicar que el estudio histológico sugiere un nivel moderado de toxicidad en los hígados, posiblemente derivadas de un efecto conjunto de los antioxidantes (BHT y BHA) y los compuestos de alteración termoxidativa del aceite.

Todo esto sugiere la necesidad de emplear un mayor número de estudios para valorar la posible toxicidad de los productos fritos en un aceite de girasol utilizado repetidas veces así como para analizar la posible toxicidad derivada de la utilización conjunta de BHT y BHA en dietas que contienen altos niveles de grasas peroxidadas.

C) UTILIZACION DE LA METODOLOGIA ADECUADA.

En esta Tesis se ha utilizado una metodología adecuada, actual y precisa tanto para la valoración de la alteración termoxidativa e hidrolítica del aceite de girasol usado en frituras como para valorar la incidencia de su inclusión en dietas para ratas sobre parámetros nutricionales y del metabolismo lipoproteico.

La valoración de la alteración termoxidativa e hidrolítica se ha realizado utilizando técnicas clásicas de uso muy extendido tanto en la industria alimentaria como en investigación, pero además se ha introducido la cuantificación de la fracción alterada de los aceites mediante una técnica de cromatografía líquida-líquida que separa los diferentes grupos de componentes alterados de los triglicéridos (polímeros de triglicéridos, dímeros de triglicéridos, triglicéridos oxidados, diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres) en razón de su peso molecular (HPSEC) cromatografía líquida de alta eficacia por exclusión de tamaño de partícula.

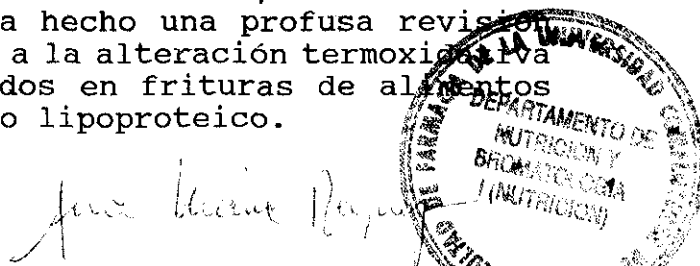
La separación y cuantificación de las lipoproteínas se realizó mediante ultracentrifugación en gradientes salinos de densidad mediante una técnica de amplia relevancia en bibliografía en la que uno de sus autores es director de esta Tesis.

Todas las técnicas utilizadas en este trabajo se hicieron siguiendo un control de calidad estricto.

El estudio histológico también se ha realizado siguiendo los criterios de calidad necesarios para su adecuada preparación y análisis.

D) ACTUALIZACION BIBLIOGRAFICA DEL TRABAJO.

La Tesis Doctoral cuenta con más de 450 citas, muchas de ellas de gran actualidad. Por tanto se ha hecho una profusa revisión bibliográfica tanto en lo referente a la alteración termoxidativa de las grasas y/o aceites utilizados en frituras de alimentos como en lo referente al metabolismo lipoproteico.



Memoria presentada por D^aSara López-Varela Celdran,
aspirante al grado de Doctor en Farmacia.

**"Alteraciones de un aceite de girasol usado en fritura.
Incidencia de su ingesta sobre parámetros nutricionales y
del metabolismo lipoproteico en ratas".**

Sara López-Varela

Fdo: Sara López-Varela Celdran.
aspirante al grado de Doctor en Farmacia

Directores

Carmen Cuesta

Fdo: Carmen Cuesta Lorenzo

F. José Sánchez-Muniz

Fdo: F. José Sánchez-Muniz

Ana M^a. Requejo

V^oB^o Directora del Departamento.
Fdo: Ana M^a. Requejo Marcos.

Esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología I (U.C.M) y en el Instituto de Nutrición y Bromatología (C.S.I.C), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040-Madrid; y financiado en su totalidad por el proyecto ALI.88-0696 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT).

ABREVIATURAS

- ACAT: Acil coenzima A acil-transferasa.
- APO: Apoproteínas.
- CE: Colesterol esterificado.
- CEA: Coeficiente de eficacia alimentaria.
- CL: Colesterol libre.
- CT: Colesterol total.
- EC: Esteres de colesterol.
- FL: Fosfolípidos.
- HDL: Lipoproteínas de alta densidad.
- HDLn: Lipoproteínas de alta densidad nacientes.
- HDL1,2,3,c: Otros subtipos de lipoproteínas de alta densidad.
- HMG CoA: Hidroxi metil glutaril Coenzima A.
- HMG CoA reductasa: Hidroxi metil glutaril Coenzima A reductasa.
- HPSEC: Cromatografía de alta eficacia de exclusión por tamaño de partícula.
- IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia.
- LCAT: Lecitin colesterol acil transferasa.
- LDL: Lipoproteínas de baja densidad.
- LPL: Lipoproteín lipasa.
- PER: Coeficiente de eficacia proteica.
- PGE2: Prostaglandina E2.
- PUFA: Acidos grasos poliinsaturados.
- TG: Triglicéridos.
- TPL: Transportador proteico lipídico.
- VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

A mi marido,
a mis padres,

Deseo expresar mi agradecimiento a:

Drª. Dª. Carmen Cuesta Lorenzo y al Profesor Dr. D. Francisco José Sánchez-Muniz por su dirección, paciencia, confianza y apoyo. Por haber sabido transmitirme su ilusión por este trabajo, pero ante todo por su amistad y tolerancia con mis muchos defectos.

A la profesora Drª. Dª. Ana María Requejo Marcos, por su confianza al permitirme realizar esta Tesis en el Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición). Por su gran apoyo, amistad y confianza.

A Feliciano, Juan, MªLuz, Pili y MªRosa por su colaboración y ayuda en el momento oportuno.

A Jesús, Mercedes, Ana, Teruca, Sara, Pablo, Paca, Esther, Teresa, María y MªJosé por ser los compañeros que me supieron hacer más grato el trabajo y me ayudaron y animaron en los momentos malos. Por su gran amistad y apoyo.

A Carmen Garrido Polonio por su gran ayuda, confianza y amistad en los malos y buenos momentos.

A Ruth Arroyo, por su ayuda en la determinación de los compuestos de alteración termoxidativa e hidrolítica. Por su amistad.

A Pilar Navarro, Pilar Vaquero, Ana Castrillón, Ascensión Marcos, Pilar Varela, Elena Asensio e Isabel Orvay por su amistad y ayuda cuando los necesité.

A todos mis compañeros del Departamento y del Instituto, con los que he trabajado a lo largo de este tiempo, por estar ahí cuando los necesité.

A las Doctoras MªCarmen Pérez-Camino y MªCarmen Dobarganes del Instituto de la Grasa de Sevilla por su ayuda y colaboración.

A la Lda. MªCarmen Bravo Llatas, por su asesoramiento en la realización del tratamiento estadístico de esta Tesis Doctoral.

A la Drª. Juana María Flores, profesora titular del Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de la U.C.M. por la realización del estudio histológico.

A Araceli y Marita Santamaría, por haber realizado la labor más ingrata de la Tesis al mecanografiarla y mantener siempre su sonrisa a pesar de los continuos cambios y remodelaciones. Por su amistad y paciencia.

A mis padres por su apoyo incondicional y por su cariñosa preocupación; al resto de mi familia por su paciencia, cariño y apoyo.

A mi marido por su apoyo y ayuda en todo momento, por su confianza y su paciencia infinita.

A mis hijos por sufrir sin comprender todas las locuras de su madre durante este tiempo.

A todos gracias.

INDICE

	Pag.
1. REVISION BIBLIOGRAFICA	1
1.1. Introducción	2
1.2. La fritura de los alimentos. Variables de este proceder culinario que influyen en los cambios de las grasas culinarias.	6
1.3. Cambios en las grasas culinarias durante las frituras.	28
1.4. Evaluación analítica de la alteración.	38
1.4.1. Indices analíticos de caracter general	39
1.4.2. Evaluación de la alteración total	41
1.4.3. Cuantificación de los componentes específicos de la alteración.	45
1.5. Papel del hígado en el metabolismo lipídico y lipoproteico.	47
1.5.1. Metabolismo lipoproteico	47
1.5.2. Componentes grasos hepáticos	61
1.5.3. Influencia de los diferentes tipos de ácidos grasos sobre el metabolismo lipoproteico.	66
1.6. Incidencia de la ingesta de grasas alteradas por la fritura sobre diferentes parámetros de evaluación nutricional, toxicológica y sobre lipoproteinemia de ratas.	74
1.6.1. Efectos sobre parámetros de evaluación nutricional y toxicológica.	74
1.6.1.1. Ingesta y crecimiento.	74
1.6.1.2. Utilización digestiva y metabólica.	78
1.6.1.3. Toxicidad de las grasas calentadas o utilizadas en fritura.	82
1.6.2. Efectos sobre lipemia y lipoproteinemia	85
1.6.3. Estudio histológico.	89

	Pag.
2. OBJETIVOS E INTERES DEL TRABAJO.	91
3. MATERIAL Y METODOS.	93
3.1. Diseño experimental	94
3.1.1. Condiciones de fritura.	94
3.1.2. Recogida, preparación y tratamiento de los aceites.	96
3.1.3. Animales e instalaciones.	97
3.1.4. Dietas.	97
3.1.5. Desarrollo de la experiencia.	103
3.1.6. Parámetros controlados.	103
3.2. Técnicas analíticas.	106
3.2.1. Análisis en el aceite del baño de fritura.	106
3.2.1.1. Variación de la temperatura durante el proceso de fritura.	106
3.2.1.2. Rendimiento.	106
3.2.1.3. Estado del aceite del baño de fritura	106
3.2.1.3.1. Índices analíticos de caracter general....	107
1a - Índice de refracción	107
1b - Índice de color	107
1c - Determinación de la acidez libre	107
1d - Medida espectrofotométrica de la absorción en la región u.v. a 270 nm.	108
3.2.1.3.2. Métodos analíticos para la evaluación de la alteración total.	109
2a - Determinación cuantitativa de los tri- glicéridos no polares y de compuestos polares del aceite.	109
2b - Determinación de los ésteres metílicos no alterados y alterados del aceite mediante cromatografía de absorción en gel de sílice.	111
2c - Determinación del contenido relativo y absoluto de ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía gaseosa.	112
2d - Determinación del contenido relativo y absoluto de los diferentes productos de alteración termoxidativa e hidrolítica. ..	113

	Pag.
3.2.2. Análisis de las dietas.	115
3.2.2.1. Humedad	115
3.2.2.2. Proteína	115
3.2.2.3. Grasa	115
3.2.2.4. Cenizas	115
3.2.3. Análisis en suero, hígado y heces.	116
3.2.3.1. Humedad	116
3.2.3.2. Proteína	116
3.2.3.3. Lípidos totales	116
3.2.3.4. Separación de lipoproteínas	116
3.2.3.5. Determinación de colesterol total	118
3.2.3.6. Determinación de colesterol libre	119
3.2.3.7. Determinación de colesterol esterificado.	120
3.2.3.8. Determinación de fosfolípidos	120
3.2.3.9. Determinación de triglicéridos	121
3.2.3.10. Obtención de ésteres metílicos en hígado. Determinación de ácidos grasos en hígado por cromatografía gaseosa.	121
3.2.3.11. Estudio histológico.	123
3.2.4. Control de calidad.	124
3.3. Índices utilizados.	125
3.3.1. Coeficiente de eficacia alimentaria.	125
3.3.2. Coeficiente de eficacia proteica.	125
3.3.3. Coeficiente de digestibilidad aparente o utilización digestiva.	125
3.3.4. Índice hepatosomático.	125
3.4. Método estadístico.	126
4. RESULTADOS	128
4.1. Expresión de resultados.	129

	Pag.
5. DISCUSION DE RESULTADOS	221
5.1. Variaciones en el aceite de fritura.	222
5.1.1. Variaciones de la temperatura en el aceite del baño durante el proceso de fritura.	222
5.1.2. Rendimiento.	223
5.1.2.1. Pérdida de volúmen de aceite del baño de fritura.	223
5.1.2.2. Variaciones del peso del alimento frito en relación con el alimento crudo.	224
5.1.3. Variaciones en los índices analíticos de caracter general.	225
5.1.3.1. Índice de refracción	225
5.1.3.2. Índice de color	226
5.1.3.3. Índice de acidez	227
5.1.3.4. Medida espectrofotométrica de la absorción en u.v. a 270 nm.	228
5.1.4. Métodos analíticos para la evaluación de la alteración total.	229
5.1.4.1. Determinación cuantitativa de las fracciones alteradas y no alteradas de triglicéridos.	229
5.1.4.2. Variaciones de las fracciones no polar y polar de ésteres metílicos. ...	231
5.1.4.3. Determinación del contenido relativo y absoluto de ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía gaseosa.	233
5.1.4.4. Determinación de productos de alteración termoxidativa e hidrolítica.	237
5.1.5. Correlaciones.	242
5.2. Efectos de la ingesta de las dietas experimentales sobre parámetros de evaluación nutricional y toxicológica, lipemia y lipoproteinemia de ratas.	246
5.2.1. Efectos sobre Ingesta y Peso	246
5.2.2. Utilización digestiva y metabólica de las dietas experimentales.	250

	Pag.
5.2.3. Efectos del consumo de las dietas experimentales sobre peso de hígado, composición porcentual e índice relativo hepatosomático:	253
5.2.4. Efectos del consumo de las dietas experimentales sobre Lípidos hepáticos	255
5.2.5. Efectos del consumo de las dietas experimentales sobre la composición de ácidos grasos totales hepáticos	257
5.2.6. Estudio histológico	260
5.2.7. Efecto sobre la lipemia	265
5.2.8. Efecto sobre la lipoproteínemia.....	271
 6. RESUMEN Y CONCLUSIONES	 280
 7. BIBLIOGRAFIA	 288

1. REVISION BIBLIOGRAFICA.

1.1. INTRODUCCION

Una de las características de la " dieta mediterránea " es el consumo de alimentos fritos. Como es sabido, la fritura es un proceso culinario que consiste en introducir el alimento en un aceite o grasa caliente, en presencia de aire, durante un determinado periodo de tiempo.

En la actualidad, este proceder culinario, está extendido a nivel mundial, ya que además de una preparación rápida de los alimentos, éstos adquieren junto con una textura crujiente y dorada, unas óptimas condiciones organolépticas y una gran palatabilidad (Varela, 1988).

Bull (1983) describe cómo la fritura se ha impuesto en los últimos años en la preparación de alimentos, sobre todo pescado y patatas.

No obstante, con el empleo de freidoras, cuyas capacidades oscilan entre 3 y 5 litros en las freidoras domésticas hasta 5,10 ó 25 litros en las usadas en la industria de catering, a pequeña y media escala respectivamente, la grasa está sometida a sucesivos calentamientos y a la acción durante los mismos, de tres principales variables que pueden influir negativamente en su estructura y calidad:

- La humedad procedente del alimento que es la causante de la alteración hidrolítica.
- El oxígeno del aire que entra en contacto con el aceite en la superficie del recipiente y que produce la alteración oxidativa.
- La relativamente elevada temperatura en que se realiza la fritura (alrededor de 180 °C), la cual da origen a la alteración térmica (Dobarganes y col., 1988,1989).

La variedad de compuestos que se pueden formar durante el proceso de fritura, es inherente también a las múltiples variables implicadas en el mismo, así Rojo y Perkins (1987), describen que este proceso está considerablemente influido por las características del alimento que se frie, la composición de la grasa y las condiciones de fritura: temperatura, exposición al oxígeno, periodo de calentamiento, capacidad de fritura (Kg alimento/h), fritura continua ó intermitente, modo de transmisión del calor, metales en contacto con el aceite, limpieza de la freidora, cantidad de aceite que se emplea

en la reposición del aceite perdido por la freidora y calidad inicial del aceite.

Este proceso tan complejo hizo que se usasen, desde el principio, diseños en los cuales se describen cada una de las variables que pueden afectar al proceso de fritura llevado a cabo con una grasa o aceite en particular. Estos modelos han sido empleados con el objeto de simplificar y controlar los diferentes parámetros que afectan a las frituras de alimentos. Nuestro equipo ha descrito diferentes diseños experimentales de fritura (Hernández y col., 1989; Sánchez-Muniz y col., 1989; Cuesta y col., 1988).

En este trabajo nos interesa incidir sobre un aspecto que puede influir decisivamente en la calidad de la grasa empleada en la fritura y es el hecho de la adición frecuente de aceite sin usar a la freidora, con el objeto de reemplazar la pérdida de aceite de dicha freidora, debido a la apreciable cantidad del mismo que es absorbido por el alimento frito. Sobre este aspecto hemos de recordar que las patatas chips absorben de un 25 a un 40% de aceite. (Figueroa, 1984; Guillaumin, 1988; Sánchez-Muniz y col., 1989, 1992a).

En trabajos previos, nuestro equipo ha investigado la alteración de diferentes aceites usados en fritura sin reposición de volumen de la freidora, con aceite fresco, ya que mediante un particular diseño, esta reposición se hacía con aceite ya usado previamente, procedente de otras freidoras (Hernández y col., 1989; Arroyo y col., 1992; Garrido-Polonio, 1991).

Existe un debate sobre cómo puede influir en el deterioro del aceite de la freidora, una reposición lenta ó frecuente de dicho aceite con aceite sin usar. (Billek, 1985).

Morton y Chidley (1988), describen que las freidoras empleadas en la industria pueden procesar desde 100 hasta 2000 Kg de productos por hora, siendo una adecuada reposición del aceite de la freidora un importante punto a considerar para intentar prolongar la vida útil de un aceite. En un proceso de fritura bien organizado debería alcanzarse un cierto equilibrio en el cual la degradación causada por el calor/oxidación esté minimizada por la adición de aceite fresco y la continua sustracción de una significativa proporción del aceite usado por la absorción del mismo por el alimento frito.

Otro aspecto a resaltar de esta investigación, es el hecho de que la fritura fue realizada repetida e intermitentemente, hecho ligado a un incremento en la degradación de los lípidos, debido probablemente a la

formación de peróxidos y a los productos de descomposición durante los sucesivos ciclos de recalentamiento, fritura y enfriamiento.

Numerosos países, Alemania, Bélgica, Francia, Israel, Japón, etc., (Firestone y col., 1991; Blumenthal, 1991) han establecido normativas para definir la calidad de las grasas calentadas.

Recientemente el B.O.E ha publicado la orden por la que se aprueba la Norma de Calidad para los aceites y grasas calentadas (Ministerio de Relaciones con las Cortes y de Secretaria de Gobierno, 1989). En ella se señala que el contenido de productos derivados de la alteración de triglicéridos de las grasas calentadas debe ser inferior al 25%, a partir del cual éstas deberán desecharse.

La toxicidad potencial de las grasas por otra parte está relacionada con la presencia de compuestos específicos de alteración ya que no todos los productos con más polaridad que los triglicéridos pueden considerarse tóxicos. Así parece importante para valorar el tipo de alteración (termoxidativa o hidrolítica), el empleo de la cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión por tamaño de partícula (HPSEC), ya que esta técnica permite la posibilidad de identificar y cuantificar los compuestos específicos de alteración: polímeros y dímeros de triglicéridos, triglicéridos oxidados, diglicéridos y ácidos grasos libres (Dobarganes y col., 1988; Christopoulou y Perkins, 1989).

Como hemos señalado el número y variedad de compuestos formados durante la fritura es grande, y aunque han sido descritas algunas de las consecuencias nutricionales y toxicológicas de su ingesta (Causeret, 1982; Gómez-Elvira, 1987; Márquez-Ruiz y col., 1990a), todavía son prácticamente desconocidos hasta qué punto los productos específicos de la degradación de las grasas por la fritura inciden sobre diferentes parámetros del metabolismo lípido, proteico, mineral, etc.

A este respecto, nuestro Departamento viene trabajando sobre estos interesantes objetivos habiendo obtenido dos proyectos de investigación, (C.A.Y.C.I.T con D.I. 805, titulado "Repercusiones del consumo de aceite de oliva sometido al proceso de fritura sobre el metabolismo lipídico y mineraloproteico en periodos de intenso anabolismo" y C.I.C.Y.T proyecto ALI 88-0696 titulado "Influencia del consumo de grasas crudas y procedentes de frituras sobre la biodisponibilidad y metabolismo lipídico y mineral"), para conocer la influencia del consumo de grasas utilizadas en fritura sobre el metabolismo lipídico y lipoproteico. Estudios

previos sugieren pequeñas modificaciones en las que podemos resaltar un incremento de la colesterolemia, modificación del cociente colesterol/fosfolípidos de algunas lipoproteínas, así como una tendencia a la disminución de la trigliceridemia. No obstante, en estos estudios previos no se abordó en profundidad el estudio del grado de alteración de la grasa administrada a los animales de experimentación, hecho que se aborda con amplitud en el presente trabajo, permitiendo este hecho establecer más objetivamente la relación grado de alteración de la grasa/ efectos nutricionales y otros parámetros.

1.2. LA FRITURA DE LOS ALIMENTOS. VARIABLES DE ESTE PROCEDER CULINARIO QUE INFLUYEN EN LOS CAMBIOS DE LAS GRASAS CULINARIAS.

1.2.1. Variables dependientes del proceso.

1.2.1.1. Temperatura.

Las alteraciones de las grasas culinarias producidas por la temperatura, han sido descritas por muchos autores (Perkins y Akkeren, 1965; Lomanno y Nawar, 1982), señalándose que a partir de los 200°C el efecto es mucho más drástico (Gere, 1983a).

A este respecto, cabe comentar que es mucho más abundante la bibliografía relacionada con sobrecalentamiento que con fritura.

Fedeli (1988) en sus trabajos sobre fritura, describe que la velocidad de degradación de un aceite es proporcional a la temperatura de calentamiento y al tiempo que dura el proceso de fritura.

Robertson (1967) afirma que la temperatura de fritura no debe ser tan alta que queme la grasa, incluso localmente. Según este autor, el calor requerido para la fritura debe ser distribuido lo más uniformemente posible a lo largo de un amplio área de superficie de calentamiento.

Según Stevenson y col (1984) las reacciones térmicas tienen lugar preferentemente en las capas más bajas del recipiente, dado el menor acceso de aire. Parece claro que aunque la capacidad de absorción de oxígeno por la grasa disminuye al aumentar la temperatura, este efecto se compensa al favorecerse la continua entrada de aire por el incremento de las reacciones oxidativas con la temperatura.

Además, hay que tener en cuenta, la relación que existe entre la temperatura del baño y la formación de surfactantes en el mismo (Blumenthal, 1991) ya que las altas concentraciones de surfactantes aumentan el ritmo de descomposición del aceite, debido a que el aceite moja las resistencias. El aceite se carboniza - a las temperaturas altas en las superficies de calentamiento. Esta carbonización produce compuestos de color rojo que representan la mayor parte del color en los aceites usados así como también la mayoría de los ácidos cíclicos y de otros compuestos considerados como indeseables.

Es importante comentar, que la fritura es un proceso dinámico donde la temperatura del baño de fritura varía debido a la adición del alimento y a los procesos de evaporación de agua y absorción de grasa.

1.2.1.2. Tiempo y tipo de calentamiento.

Un incremento en la duración del proceso de fritura, produce una mayor alteración (Morrison y Robertson, 1978; Bracco y col., 1981). Por otra parte, el tiempo de calentamiento determina la estabilidad y la formación de diferentes compuestos de alteración (Nawar, 1985a).

Así, la formación de polímeros sucede en tiempos de calentamiento cortos, aunque tales productos presentan gran estabilidad a largo plazo.

Según Peerss y Swoboda (1982) el tipo de calentamiento también es decisivo, ya que si éste es discontinuo produce mayor degradación en la grasa que el continuo.

Estos autores indican que la pérdida de ácidos grasos insaturados es característico del deterioro oxidativo, ya que el descenso de ácido linoléico (C18:2) era más grande que el de ácido oleico (C18:1). Además, señalan que alrededor de un 25% del contenido de linoléico del aceite de girasol se destruía durante un experimento de frituras de patatas realizado de forma intermitente (discontinua), mientras que un experimento paralelo de fritura continua de patatas, sólo se destruía un 5%.

Los triglicéridos no reactivos también decrecieron mucho más, durante la fritura intermitente, siendo la alteración final de un 40%, mientras en la fritura continua la pérdida de triglicéridos fue sólo de un 10%.

El color del aceite sufrió un oscurecimiento en ambos experimentos, pero mucho más marcado para la fritura intermitente que para la continua.

También se observó un incremento en la absorción a 230 y 270 nm como era de esperar, debido a la degradación oxidativa del ácido linoléico presente en el aceite de fritura. En ambos experimentos se observó un decrecimiento de la acidez, pero en la fritura continua la acidez se incrementó ligeramente sobre el valor inicial después de más de 30 frituras, mientras que con la fritura intermitente la acidez se incrementó

progresivamente después de 10 frituras y alcanzó un valor de 0,35% de ácido oleico después de las 40 frituras.

Peerss y Swoboda (1982) establecen además unos comentarios subjetivos sobre la calidad de las patatas "chips" producidas, indicándose que durante las frituras continuas, no se observan cambios deletéreos en las mismas, ya que las "chips" estaban bien cocinadas y tostadas en la fritura 40 y eran bien aceptadas. Sin embargo durante las frituras intermitentes, después de la fritura 20, la formación de espuma era grande y el problema llegó a ser tan serio que las "chips" debían de ser sumergidas mucho más lentamente en el aceite caliente. La fritura se realizaba entonces inadecuadamente y las "chips" no eran crujientes ni tostadas y también resultaban a causa de su contenido graso, impalatables.

Finalmente como ambos experimentos se realizaron sin reposición de aceite, hubo un decrecimiento del volumen de aceite, por la absorción del mismo por las patatas de un 30% para la fritura intermitente y de un 25% para la fritura continua.

1.2.1.3. Relación superficie/volumen de la freidora o sartén.

Al aumentar la cantidad de grasa de fritura en contacto con el aire, debido al incremento de la relación superficie/volumen, se ejerce un efecto determinante sobre la velocidad de alteración de la grasa culinaria (Bracco y col., 1981), aumentando la posibilidad de las reacciones oxidativas. Esto justifica, al menos en parte, la utilización de sartenes hondas de gran capacidad en el área Mediterránea, o en su defecto, el de freidoras.

1.2.1.4. Adición de aceite nuevo.

La adición de aceite nuevo, práctica habitual para compensar las pérdidas de volumen de aceite debidas a la capacidad del alimento de absorber la grasa culinaria, podría ser beneficiosa ya que produce una dilución de los productos de alteración. Sin embargo, para unos autores, sería beneficioso añadir aceite frecuentemente, (Robertson, 1967; Billek, 1985; Pérez-Camino y col., 1987), mientras que otros como Gere (1982) mediante experiencias paralelas de fritura, en un

caso con adición de aceite "fresco" para compensar el que ha sido absorbido por el producto frito, y en otros sin adición, comprobó que el aceite se deteriora más rápidamente al adicionar aceite fresco, siendo esto atribuido al efecto catalítico de los productos de degradación presentes en el aceite usado, los cuales promueven el deterioro del que ha sido adicionado. Resultados similares obtuvieron Stevenson y col. (1984).

1.2.1.5. Equipos de fritura.

Básicamente, el proceso tiene lugar en sartén o freidoras para uso doméstico y restaurantes, o bien en freidoras usadas a escala industrial para producir grandes cantidades de alimentos fritos (patatas, cacahuetes, etc) y prefritos con fines comerciales.

En una excelente revisión puesta a punto por Morton y Chidley (1988) y en otra por Cuesta y Sánchez-Muniz (1991c), se describen las características de estos equipos.

Las freidoras domésticas tienen una capacidad de 2-5 litros, mientras que en las usadas en la industria del "catering" oscila entre 5 y 25 Kg. Ambas están fabricadas en acero inoxidable e igualmente ambas utilizan para el calentamiento del aceite, resistencias eléctricas situadas en la base, para lo cual están sumergidas apropiadamente, y son controladas mediante termostatos.

No obstante, se debe vigilar la temperatura periódicamente con termómetros, ya que según Blumenthal (1991) durante la fritura se produce la formación de una finísima capa aislante sobre las resistencias, cuya formación depende del grado de alteración del aceite o grasa culinaria y en particular de la formación de surfactante. Dicho surfactante carbonizaría sobre las superficies de las resistencias, produciendo una capa aislante, demandando al sistema controles térmicos más elevados por parte del termostato.

Es aconsejable, para evitar el posible sobrecalentamiento del aceite, establecer corrientes de convección o más sencillamente agitar el cestillo de la freidora durante la fritura.

El rango de temperatura en el "catering" debería estar entre 165-185°C. Esto significa que la temperatura más alta que se puede alcanzar en estas condiciones sería al menos 20°C por debajo del punto de humo. El nivel de aceite se mantiene por reemplazamientos periódicos con

aceite fresco. También es conveniente señalar que la freidora no debe estar sobrecargada de alimento y que no debe sobrepasarse el tiempo de fritura, para que la calidad del producto de la fritura no se vea alterada. Una relación 6:1 de aceite alimento es la que normalmente se emplea. Nuestro equipo utiliza en fritura de patatas en freidora la relación 6:1 (Hernández y col., 1989; Sánchez-Muniz y col., 1989), mientras que para fritura de sardinas la relación se mantiene entre 4,6-5:1 (Sánchez-Muniz y col., 1990b).

Las freidoras llevan una tapa de metal apropiado para limitar el contacto del aceite con el aire, durante los largos periodos de tiempo en que no son usados.

En las freidoras utilizadas a escala industrial, hay un volumen continuo de aceite que suele ser de 200-500 Kg. Diversas casas manufactureras como Florigo BV. (Holanda) y Sandvick Design and Processing Engineering (Sandvick D+PE, U.S.A.) han diseñado modelos ampliamente aceptados en el mercado mundial. Tales freidoras están diseñadas de forma que haya una temperatura uniforme en el aceite del baño ($180^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) y una baja diferencia de temperatura entre el calor de los tubos de las resistencias eléctricas y el aceite que los rodea. Esto evita los "puntos de calor" y la penetración de restos quemados en la superficie de los tubos de calentamiento (Morton y Chidley, 1988).

Dispositivos especiales en la caldera reducen el volumen total del aceite en uso y hacen posible una renovación del mismo cada dos o tres horas. Una continua renovación de los sedimentos desde la base de la cuba permite que la temperatura sea uniforme y esto contribuye a una baja producción de ácidos grasos libres (máximo 0,5%), y a un mejor sabor, color y apariencia de los productos finales.

En términos de producción, estas freidoras industriales pueden procesar de 100 a 2.000 kg de producto por horas. En un proceso bien organizado, la degradación causada por el calor y la oxidación se minimiza si se consigue alcanzar un equilibrio entre el flujo de aceite fresco añadido y la absorción de aceite usado por el producto frito.

Otros países se han interesado también en la fritura. La Swedish Gothendurg School, (citada por Morton y Chidley, 1988) ha considerado las ventajas de esta técnica como son la producción de unos alimentos tostados muy agradables, y las pequeñas pérdidas en su valor nutritivo.

Los investigadores suecos han contribuido

analíticos de carácter general (Iodo, refracción y peróxidos) fueron menores al freír en sartenes de hierro, ya que se freía ininterumpidamente en el aceite caliente, mientras que en los ensayos en freidoras domésticas, se dejaba enfriar el aceite entre frituras, lo cual contribuye como es sabido, a favorecer cambios en las grasas de fritura. No obstante en Andalucía es muy común la utilización de sartenes profundas de hierro, en donde la superficie del aceite en contacto con el aire es relativamente pequeña en comparación con el volumen de aceite que puede contener (Varela y col., 1983).

Dada la posible implicación del aluminio en la enfermedad de Alzheimer, en algunos países se ha considerado la retirada del mercado de vasijas que contengan aluminio, (del Castillo, 1991. Comunicación personal).

Robertson, en 1967, se refiere a los materiales más adecuados para realizar la fritura señalándose el aluminio, nickel y acero inoxidable como los más idóneos.

1.2.1.8. Transferencia de calor

- El medio de transferencia de calor, esto es el aceite de fritura es un compuesto no acuoso, mientras que el alimento contiene altas o muy altas proporciones de agua (Keller y Escher, 1989).

- Para que se produzca la fritura o cocción, el calor debe ser transferido desde el medio no acuoso, aceite, al medio primordialmente acuoso, alimento.

- Cualquier cambio en la capacidad del aceite para transferir calor o cocinar, incluyendo la interfase aceite-alimento debe ser el resultado de los productos de descomposición o de la interacción del aceite.

- Los compuestos del alimento que el aceite extrae, los compuestos de descomposición del aceite mismo y el oxígeno absorbido en la interfase aceite-aire, todos contribuyen a que el aceite cambie de un medio que es casi un triglicérido puro a una mezcla de cientos de compuestos (Artman, 1969; Fritsch, 1981).

- Aquellos compuestos que afectan la transferencia de calor, en la interfase aceite-alimento, han de actuar reduciendo la tensión superficial entre esos 2 materiales no miscibles. Estos compuestos actúan como agentes humectantes y son considerados surfactantes (Miller y Neogi, 1985; Fisher y col., 1985).

- A medida que el aceite se va descomponiendo, se van formando más surfactantes que ocasionan un aumento en el tiempo de contacto entre el alimento y el aceite. Esto hace que el alimento absorba aceite en exceso y que la tasa de transferencia de calor a la superficie del alimento aumente. Con el tiempo, la superficie del alimento se seca y oscurece, mientras que la conducción de calor hacia el interior se mantiene constante y no puede acelerarse por medio de cambios en el aceite.

1.2.2. Variables dependientes del tipo de grasa culinaria

1.2.2.1. Aceite de girasol. Características y composición

La composición química y las constantes físicas y fisicoquímicas de la grasa culinaria son otras variables a considerar en la fritura.

El aceite de girasol se extrae de las semillas de *Helianthus annuus*, de la familia Asteráceas. Se obtiene por presión de las semillas descascarilladas y secas o por extracción con disolventes.

Según El-Shattory y Taha (1980), la composición en ácidos grasos del aceite de girasol varía según proceda de la variedad descascarillada o de la variedad blanca. Así mismo, la composición en ácidos grasos varía ligeramente cuando estas semillas son calentadas con calor seco. Estos cambios se detallan en la Tabla A de la página siguiente.

Put y col. (citado por El-Shattory y Taha 1980) señalan que el aceite de girasol es rico en ácidos grasos poliinsaturados y debe contener entre 65-75% de ácido linoléico, con sólo trazas de linolénico (0,1 - 0,3%).

Estos mismos autores puntualizan que el aceite de girasol cuando se calienta puede sufrir polimeraciones y sugieren que su reutilización debe ser limitada cuando se frien patatas y otros alimentos.

TABLA A: Composición porcentual de los principales ácidos grasos de la semilla del H. annuus obtenidos por calentamiento seco. Composición según variedad.

	Variedad descascarillada		Variedad Blanca	
<u>Ac.grasos</u>	<u>Control</u>	<u>Calentamiento</u> <u>Seco</u>	<u>Control</u>	<u>Calentamiento</u> <u>Seco</u>
Palmítico(%)	7,0	7,2	6,2	6,0
Esteárico(%)	3,2	3,0	2,6	2,4
Oleico(%)	34,3	33,5	52,1	52,5
Linoléico(%)	55,6	56,3	39,1	39,1

Adaptado de El-Shattory y Taha (1980).

La composición del aceite de girasol utilizado por Harwood y Geyer (1975), fue la siguiente (datos en %):

Palmítico	5,6
Palmitoleico	Trazas
Esteárico	2,2
Oleico	21,5
Linoléico	66,2

Según Guillaumin y col. (1978), la composición porcentual del aceite de girasol es la siguiente:

Palmítico	6,3
Palmitoleico	0,1
Esteárico	5,2
Oleico	18,2
Linoléico	67,3

La composición del aceite de girasol utilizado por Figueroa (1984) fue la siguiente (datos en %):

Palmítico	7,0
Palmitoleico	0,1
Esteárico	5,2
Oleico	23,4
Linoléico	64,4

Según Paccalin y Julliet (1982) el aceite de girasol, prácticamente desprovisto de ácido linolénico, es el más consumido a pesar de su gran labilidad frente al calor. El mismo autor señala que, como todos los aceites insaturados, es preferible no calentarlos a más de 180°C, ni usarlo en frituras repetidas más de 8 o 10 veces.

La insaturación de la grasa influye en el grado de oxidación de la misma, ya que según Frankel (1985) la velocidad de autooxidación de tres ácidos grasos constituyentes de las grasas, como el oleico, linoléico y linolénico, es proporcional a 1:40-50:100, en lo referente a la absorción de oxígeno y a 1:12:25 en cuanto al desarrollo de hidroperóxidos.

También según Dobarganes y Pérez-Camino (1986) durante el tratamiento oxidativo, todos los ácidos grasos, a excepción de los saturados, experimentan una degradación apreciable, tanto más elevada, cuanto mayor es el grado de insaturación. Por ello sino existiera dilución del aceite de fritura por la grasa del alimento, las cantidades reales de C16:0 (palmítico) y C18:0 (esteárico) deberían permanecer constantes independientemente del grado de alteración, mientras disminuirían las cantidades de C16:1 (palmitoleico): C18:1 (oleico) y especialmente C18:2 (linoléico).

No obstante, hay que considerar que estas diferencias fueron obtenidas en condiciones de bajas temperaturas y con mezclas de ácidos grasos diferentes a los que se producirían al estar estos ácidos grasos formando parte de triglicéridos, con lo que puede haber interacciones entre ellos. Estudios posteriores, demuestran que en condiciones termoxidativas, las diferencias atribuibles a la composición de la grasa no son tan drásticas como se podría esperar, (Chang y col. 1978; Steveson y col., 1984; Gutierrez González-Quijano y Dobarganes, 1988). Hay autores que consideran que es el tipo de procedimiento empleado en la fritura el que determina el grado de deterioro de la grasa y no la composición de la misma (Chang y col., 1978).

Por otra parte, la grasa, debido a la calidad inicial, puede tener ya una determinada cantidad de peróxidos, ácidos grasos libres, etc. Estos, junto con

determinados compuestos del insaponificable (tocoferoles, esteroides, colorantes, etc.) pueden actuar como aceleradores o inhibidores de la alteración termoxidativa (Sims y col., 1972; Huang y col., 1981).

Una recomendación de tipo general sería la utilización en la fritura de una grasa de calidad sin prooxidantes y además con una insaturación media o baja.

En nuestro laboratorio se han realizado investigaciones sobre los cambios que se aprecian en las grasas empleadas en frituras (Varela, 1980; Varela y col., 1983; Rodríguez y col., 1984; Cuesta y col., 1987a; Cuesta y col., 1991a) viéndose que hay un descenso porcentual de los ácidos grasos poliinsaturados, no modificándose los ácidos grasos monoinsaturados. No obstante, Figueroa (1984) en otras experiencias efectuadas con patrón interno llegó a la conclusión de que los ácidos grasos monoinsaturados también disminuían.

Algunos autores, Brodnitz y col. (1968); Thaler y Kleinaw (1969a); Thaler y Kleinaw (1969b); Yanishlieva (1985) sugieren que todos los ácidos grasos, incluidos los saturados, serían susceptibles de alteración termoxidativa.

Para comprender el comportamiento del aceite durante el cocinado y la fritura, hay que tener en cuenta que la degradación térmica está en función de numerosos parámetros; entre éstos y directamente relacionados con el aceite, están la insaturación de los ácidos grasos, la concentración y el número de antioxidantes y la presencia de metales en el aceite (Fedeli, 1988).

Fedeli (1988) realizó un amplio estudio de la influencia de éstos y otros factores en distintos aceites (oliva, cacahuete, maíz y girasol) y llegó a las siguientes conclusiones:

- En el aceite de oliva, con un bajo contenido en ácido linoléico, la alteración está retardada por la mínima velocidad de desaparición del ácido oleico. Esto se debe a que la transformación interna de los ácidos grasos es mucho mayor en el caso de los aceites poliinsaturados que en el de los monoinsaturados.

- El aceite de oliva virgen presenta mayor resistencia a la oxidación que los demás aceites estudiados en las mismas condiciones.

- En un calentamiento prolongado, el aceite de oliva forma menos peróxidos que los otros aceites comparados. Así mismo, la concentración de los productos de descomposición también es menor.

- Respecto a la presencia de antioxidantes, en todos los aceites considerados, los únicos presentes son tocoferoles, excepto en el aceite de oliva que presenta al menos cuarenta compuestos distintos con acción antioxidante, además del alfa-tocoferol. La presencia de un gran número de distintos compuestos mejora la protección frente a la oxidación por el fenómeno de sinergismo.

El mismo autor llega a la conclusión de que el aceite de oliva, se degrada menos que los otros aceites comparados, siendo el orden de rentabilidad oliva>cacahuete>maiz>girasol.

1.2.2.2. Surfactantes

Las causas del aumento del tiempo de contacto entre el aceite y alimento son dobles (Ohlson, 1983):

- surfactantes activados por el agua
- surfactantes activados por los lípidos.

Esta teoría de surfactantes viene apoyada por la siguiente hipótesis:

La fritura es básicamente un proceso de deshidratación. Cuando se frie un alimento, el agua y los compuestos disueltos dentro de ese agua, son calentados y bombeados desde el alimento hacia el aceite que lo rodea (Varela y col., 1988).

Esta teoría puede formularse así: los surfactantes son responsables de las diferencias entre la superficie y el interior del alimento frito inducidas por el envejecimiento de los aceites (Blumenthal, 1987).

Stern y Roth (1959) citados por Blumenthal (1991), conjeturaron que podrían formarse compuestos de descomposición del aceite y actuar como surfactantes, pero ellos no poseían en su laboratorio los medios adecuados para investigar esa hipótesis.

Blumenthal y Stockler (1986) aislaron e identificaron un surfactante activado por el agua, el oleato de sodio (jabón), en una fracción muy polar de una grasa de fritura. Los jabones, los fosfolípidos y las sales inorgánicas son surfactantes activados por el agua. El grupo de surfactantes activados por los lípidos incluye los polímeros térmicos de baja polaridad y los polímeros oxidados de alta polaridad.

Los aceites de fritura usados pueden contener entre 0,5 y 1,5% de agua a las temperaturas de fritura. Una patata frita que se está friendo en un baño de aceite libera agua en forma de vapor, el cual forma burbujas en la interfase aceite-agua (Blumenthal, 1991).

A concentraciones bajas de surfactantes en el aceite, muy poca cantidad de oxígeno se incorpora al aceite. A concentraciones moderadas, la oxigenación da lugar a compuestos como los ácidos grasos oxidados, los cuales, producen buenas propiedades de transferencia de calor en el aceite y los compuestos volátiles deseables. A altas concentraciones, la incorporación de oxígeno es muy alta, de manera que la dinámica y la cinética de la descomposición del aceite son forzadas a producir ácidos grasos de cadena corta formándose depósitos de polímeros sobre las paredes de la vasija, en la superficie de las resistencias y en el cestillo de la freidora.

Concentraciones bajas de surfactantes producen escasa absorción de aceite en el alimento, y la superficie y el interior del alimento se cocinan poco. Una concentración moderada produce una absorción normal de aceite en el alimento y la cocción de las partes externa e interna es satisfactoria.

Concentraciones altas producen alimentos embebidos en aceite con la parte externa sobrecocida y la parte interna cruda.

Blumenthal (1987) sugiere que según aumente la cantidad de surfactantes en el aceite por el aumento de su uso y/o la descomposición del aceite, o según que los surfactantes se introduzcan en el aceite por accidente o con intención, todos los efectos en el alimento son función de la concentración de surfactantes en el aceite.

Para un nivel de surfactante determinado, el tiempo de permanencia del alimento en el aceite puede moderar el engrasamiento, pero el tiempo de fritura no debe cambiarse arbitrariamente para controlar la cantidad de aceite que se absorbe porque el nivel de surfactantes cambia constantemente.

Más surfactantes significa mayor formación de polímeros. A medida que la tensión superficial en la interfase con el aire disminuye y a medida que se absorbe más oxígeno, más polímeros se forman en el aceite hasta que éste se satura. Una mayor concentración de polímeros permite que se produzcan burbujas de vapor más estables, con lo que la tasa de oxigenación sube; esto puede ser observado y medido. En aceites "degradados" la formación de espuma puede observarse directamente. Estas características físicas observables se correlacionan con

el aumento de los polímeros y otros compuestos surfactantes.

Un nivel de surfactante más alto ocasiona tiempos de contacto más largos entre el aceite caliente y la superficie acuosa del alimento. Con tiempos de contacto más largos, en un periodo de tiempo determinado, se transfiere más calor del aceite al alimento. La mayor transferencia de calor produce mayor deshidratación en la superficie del alimento, lo que generalmente se traduce en una mayor emigración de agua desde el centro hacia la superficie exterior del mismo. Este fenómeno también puede observarse y medirse.

Como ya se ha señalado, al mojarse la superficie de las resistencias se produce la completa carbonización de una capa de aceite y la formación de una capa aislante alrededor de las resistencias. Esto da lugar a que la temperatura de las superficies de las resistencias aumente debido a que los controles demandan más calor sensible de la fuente de energía, a pesar de que la temperatura del aceite está todavía bastante alta.

Esta teoría puede lograr que se mejore la eficacia de producción y se produzcan alimentos más sanos y de mejor calidad si se controlan entre otros aspectos la formación de surfactantes.

1.2.2.3. Aditivos y Contaminantes.

La presencia de aditivos y contaminantes que prevengan la oxidación en las grasas puede influir en la vida útil de las mismas.

La selección y mantenimiento de una alta calidad del medio de fritura incluye varios factores, así de suma importancia es utilizar una grasa que durante su uso, desarrolle un aroma que realce el aroma propio del producto que se frie. Además el aroma de la grasa con que se frie debe ser lo suficientemente estable para mantener apetitoso el producto durante su vida útil.

Hay muchos componentes del sabor en las grasas de fritura que contribuyen a que las frituras sean de buena calidad, tengan un sabor más apetitoso.

Uno de los grupos mejor conocidos son los isómeros decadienales.

Sin embargo, Schieberle y Grosch (1981) demostraron que los decadienales se oxidan fácilmente a

hexanal y octenal, los cuales son poco apetitosos y contribuyen a otorgar sabor rancio a muchos alimentos. Además Zhang y Ho (1989) han demostrado que los isómeros decadienales calentados con el aminoácido cisteína producen compuestos de carácter sulfurado tipo cebolla y aroma a carne quemada. Estos caracteres podrían encajar o no en el carácter total del sabor que se desea que tenga la fritura (Jacobson y col., 1989).

Es preferible entonces evitar las reacciones "laterales" de los decadienales y prevenir por todos los medios posibles la oxidación de los componentes decadienales y de otros compuestos sapidificantes deseables del medio de fritura.

La concentración de antioxidantes tiene una influencia decisiva en la preservación de los aceites vegetales y debe ser evaluada desde dos puntos de vista: uno concerniente a la preservación antes de su uso y otro a la prevención de la autooxidación durante el cocinado.

Efectivamente, el grado inicial de preservación es importante en la determinación de la concentración de núcleos activos de promoción de compuestos de alteración.

Los antioxidantes comunes, incluyendo los tocoferoles, hidroxianisoles butilados (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), propilgalatos (PG), e hidroquinonas butiladas terciarias (TBHQ) retardan la oxidación a temperatura ambiente, pero son menos efectivos incluso inoperantes cuando están sujetos a altas temperaturas (Chang y Mone, 1969; Gordon y Magos, 1984). Según Augustín y Berry (1983) a pesar de que tienden a perderse por volatilización parecen ser eficaces. La adición de antioxidantes fenólicos a los aceites de fritura en combinación con siliconas ha sido recientemente estudiada por Frankel y col. (1985) señalando que el comportamiento como grasa de fritura del aceite de soja, parcialmente hidrogenado, fue mejorado por la adición de TBHQ con metilsilicona. Esto sugiere un efecto sinérgico. Los antioxidantes más utilizados aparecen en la tabla B.

TABLA B - Antioxidantes naturales y añadidos a los aceites de fritura.

- Tocoferoles naturales
- Antioxidantes naturales
- Antioxidantes químicos permitidos (a)

Butilhidroxianisol
 Butilhidroxitolueno
 Propilgalato
 Dodecilgalato
 Butilhidroquinona Terciaria (TBHQ)
 Acido cítrico (como sinergista)
 Dimetil polisiloxanos

(a) sujeto a diferentes legislaciones

- De Morton y Chidley (1988).

Otro tipo de antioxidantes, poco conocido, es el de las especias y condimentos. Kimura y Kanumori (citados por Boskou, 1988) han obtenido una patente para el uso de un antioxidante obtenido de hierbas y que contiene, entre otros, flavonoides, ácido cítrico, péptidos y aminoácidos.

En lo que concierne a los tocoferoles, antioxidantes naturales, estos son menos efectivos o incluso inactivos a elevadas temperaturas (Boskou, 1988). Gordon y Magos (1984) encontraron que la adición de 0,02 % del alfa-tocoferol calentado a 180°C no era efectivo contra la termoxidación.

Fedeli (1988) señala que el contenido en ppm de tocoferoles en el aceite de girasol es de 500, ligeramente más elevado que en el de maíz, y del orden de 3 a 5 veces que en el de oliva vírgen o refinado.

Sin embargo, la formación de productos de oxidación a 25°C muy por debajo de la temperatura de descomposición de los hidroperóxidos, fue para el aceite de girasol del orden de 2 a 3 veces más elevada que la de aceites de oliva vírgen o refinados. Entre 60 y 110°C la reacción de la descomposición de hidroperóxidos coexiste con la de su formación para determinar un balance el cual es proporcional a la temperatura, siendo menor la resistencia del aceite de girasol a la alteración que la de los aceites de oliva.

A pesar del elevado contenido de tocoferoles del aceite de girasol, la alteración a temperaturas entre 150-180°C, fue para Fedeli (1988) siempre más profunda que en los aceites de oliva, promoviéndose la formación de polímeros de ácidos grasos poliinsaturados en mayor extensión y siendo la formación de productos volátiles menor.

Las siliconas se han usado también para mejorar la estabilidad de los aceites durante el calentamiento y fritura.

Sakata y col. (1985) han señalado que el uso de aceite de palma para fritura requiere la adición indispensable de silicona para impedir la formación de espuma y la oxidación, además de servir para prolongar la vida del producto frito.

Los fitosteroles, compuestos antioxidantes naturales, también parecen ser efectivos en evitar el deterioro de los aceites por los cambios indeseables que ocurren durante el calentamiento.

Gordon y Magos (1984) han demostrado que no solamente el 4 alfa-metilesterol sino también el dimetilesterol contienen un etilideno en la cadena lateral que puede retardar la alteración del aceite durante calentamientos prolongados. El modo de acción de estos fitosteroles todavía no está dilucidado aunque existen diversas teorías a este respecto (Gordon y Magos, 1984). Es de hacer notar la eficacia de estos compuestos como antioxidantes a 180°C, a pesar de su ineficacia a bajas y medias temperaturas (Boskou, 1988).

A pesar de que Ghavani y Morton (1984), demostraron la pérdida de esteroides en un aceite de soja empleado en frituras realizadas en freidoras, estos mismos autores no fueron capaces de demostrar productos de oxidación en la fracción insaponificable del aceite. Se cree que cuando se calienta un gran volumen de aceite en una freidora hay poco aporte de oxígeno y las reacciones en las cuales participan los radicales esteroides conducen a polimerizaciones mas bien que a productos de oxidación. Entonces, cuando se llevan a cabo experimentos de calentamientos a 180°C en vasijas poco profundas, sin burbujeo de oxígeno, los esteroides no son ni oxidantes ni antioxidantes (Sims y col., 1972; Boskou y Morton, 1976).

1.2.3. Variables dependientes del alimento

1.2.3.1. Preparación

Si en un principio es decisiva la calidad del aceite, la cual determina en parte la vida útil de un aceite es decir, el número de veces que éste puede ser empleado en frituras sucesivas, es evidente que también influye el tipo de producto que va ser frito. (Rojo y

Perkins, 1987). Esto se refiere principalmente a la cantidad de grasa del alimento que puede ser cedida al baño de fritura, si bien otros componentes que se adicionan al alimento pueden tener una importancia decisiva en la calidad final del producto frito.

Por tanto, la preparación del alimento es otro factor a considerar. El mismo puede ser rebozado en harina y adicionado de sal. Esto condiciona la vida útil de un aceite y también la penetración del mismo dentro del alimento. Por otra parte, según señalan Morton y Alim (1974) la penetración del aceite dentro del alimento es diferente si el alimento se frie directamente, con una delgada cubierta de harina o bien rebozado. La fritura de pescado cuando éste ha sido cubierto de una delgada película de harina difiere de la fritura de las tiras de pescado rebozado ya que, en el último caso, el alimento es guisado más bien que frito, debido a que la grasa no penetra dentro del alimento sino que permanece fuera, en la cubierta.

Por otra parte, otro factor importante que determina el sabor de las grasas de fritura y de las frituras son los compuestos de reacción del "tostado". Kaanane y Labuza (1989) señalan que la actividad del agua es muy importante en las frituras, tanto en la fritura inicial, como en el almacenamiento del producto.

La mayoría de los rebozados son mezclas de base acuosa que contienen tanto azúcares libres como unidos a aminoácidos (que son los precursores del tostado), con una actividad acuosa cercana al nivel en el cual se produce el máximo de tostado. Dado que la reacción del tostado se acelera mucho con el aumento de la temperatura, puede producirse con facilidad una coloración oscura y un sabor amargo en el rebozado y en la grasa de fritura.

Los grupos aldehídos que aún son parte de la molécula de triglicérido pueden reaccionar con los grupos amino para dar colores y sabores amargos, difíciles de eliminar. Sin embargo, no todos los productos de reacción del tostado son indeseables. Algunos proporcionan "notas" de sabor muy positivas y otros como algunas combinaciones de azúcar-aminoácidos, aportan un efecto antioxidante apreciable. Sin embargo, muchos de los compuestos poliméricos y los ácidos grasos oxidados que se forman en las grasas y en los costados de las freidoras, también son muy amargos (Waller y col., 1983; Kaanane y Labuza, 1989).

1.2.3.2. Intercambio de grasa entre los alimentos y las grasas de fritura.

Junto con los cambios básicos de la grasa empleada en fritura es necesario considerar las interacciones que tienen lugar tanto entre las grasas y otros componentes lipófilos de los alimentos y las grasas de fritura, así como entre los productos de reacción y otros compuestos presentes en el alimento y la grasa culinaria.

Entre estos últimos estarían los producidos por reacción entre los hidroperóxidos y otros compuestos polares de alteración con grupos amino, hidroxilo, carboxilo de los componentes fundamentales del alimento. Su complicado estudio se ha iniciado en los últimos años partiendo del sistema simplificado (Sims y Fioriti, 1975).

En cuanto a la cinética de penetración de la grasa dentro del alimento ha sido muy estudiada en el ITERG de París por Guillaumin, en USA por Blumenthal y en España por Varela. Nuestro grupo también está realizando algunos trabajos en este campo (Figuerola, 1984; Hernández, 1989; Sánchez-Muniz y col., 1989; Arroyo, 1991; Sánchez-Muniz y col. 1992a).

El estudio de la fritura de alimentos más complejos que las patatas entraña mayores dificultades, habiéndose señalado que alimentos con un contenido graso elevado absorben menos grasas durante la fritura que alimentos más magros (Mai y col., 1978).

Según Guillaumin (1988), un alimento frito (patatas), tiene la siguiente estructura.

- Una capa superficial tostada producida por deshidratación de la parte exterior del alimento durante la fritura (la media de su humedad está alrededor del 3% de agua). Su formación comienza cuando la temperatura del baño está cercana a 100°C.

- Durante la fritura el alimento pierde agua, que se transforma en vapor, se forma una costra con numerosas cavidades y poros. El medio graso reemplaza parcialmente el agua perdida. El aumento de viscosidad de la grasa durante la fritura incrementa este fenómeno.

- La parte más interna es lo que constituye el alimento cocinado. El porcentaje de grasa absorbida es de un 8,5% hasta la fritura 20. No obstante, si las frituras son numerosas hay un incremento de este porcentaje, llegando a alcanzar la cantidad de grasa

absorbida por el alimento hasta un 15%.

Hay según Guillaumin (1988) diferentes parámetros que condicionan esta absorción de grasa por las patatas.

a) Dependientes del alimento:

- El contenido en agua de las patatas o su peso. Así la absorción de grasa por las patatas decrece cuando el peso específico de las patatas se incrementa.

- La superficie de contacto del alimento con el medio de fritura; a más superficie absorberá más grasa del medio.

Así, por ejemplo, una patata tipo "chip" tendrá más superficie que una patata frita a la francesa, estando el contenido graso de las tipo "chip" cercano usualmente a un 40%, mientras que para unas patatas a la francesa próximo al 9%.

En un trabajo previo realizado en nuestro departamento (Figuerola, 1984) en fritura de patatas, cortadas en rodajas de 1.5 mm de grosor, el contenido graso de las patatas osciló entre 28,7% y 40,2%, obteniéndose los valores más elevados de retención grasa en la fritura vigésima. Sánchez-Muniz y col. (1989) encuentran que el contenido graso de patatas fritas tipo "chip" en aceite de oliva fue del 27,3% en la fritura número 15; estos mismos autores (Sánchez-Muniz y col. 1992a) señalan un contenido graso en patatas fritas en aceite de girasol entre en 27-40%.

b) Dependientes de la grasa:

La estabilidad de la grasa al calor depende del grado de insaturación de los ácidos grasos y de la presencia en cantidad considerable de triglicéridos poliinsaturados. Así, por ejemplo, la trilinoleína en el aceite de girasol representa un 35% de los glicéridos totales. Esta observación es también válida para el aceite de soja, con un 15% (Selke y Rohwedder, 1983).

La autooxidación y la oxidación y polimerización térmica causan un incremento en la viscosidad del medio de fritura, lo cual incrementa la absorción de aceite por el alimento.

Varela y col. (citados por Guillaumin, 1988), usando un método fluorimétrico determinaron el área donde se absorbe preferentemente la grasa en el alimento frito. Encontraron que es en la costra donde se acumula principalmente la grasa en el alimento frito. Otras grasas producían una costra más gruesa y menos compacta y definida.

Los aceites de fritura usados pueden contener entre 0,5 y 1,5% de agua a las temperaturas de fritura. Una patata frita que se está friendo en un baño de aceite, libera agua en forma de vapor, el cual forma burbujas en la interfase aceite-aire. Un aceite "nuevo" tiene una tensión interfacial muy alta, por lo que las pequeñas burbujas que se forman en la superficie del aceite se rompen rápidamente, por las bajas concentraciones de polímeros presentes en el aceite. En aceites "frescos", también se forman pequeñas burbujas de vapor cuando se frie cualquier alimento, pero éstas perduran más que las que se forman en aceites que contienen sólo trazas de polímeros. En aceites "óptimos" que tienen una tensión interfacial moderada, se producen burbujas de tamaño mediano. En aceites "degradados", con tensión interfacial baja se observan burbujas grandes y persistentes. En aceites "galopantes", con tensión interfacial muy baja, se forman burbujas grandes y pequeñas muy persistentes y que se apilan, es decir, se produce espuma (Blumenthal, 1991).

c) Condiciones de fritura:

- Influencia de la temperatura. Varela (citado por Guillaumin, 1988) estableció que la temperatura de la grasa del medio de fritura, la cual se sitúa como ya dijimos entre 150°C y 180°C, no tiene un efecto significativo sobre la absorción de grasa por el alimento frito.

No obstante, si consideramos una temperatura más elevada (por encima de los 220°C) cuando la temperatura se incrementa, se absorbe menos aceite. Sin embargo, estas consideraciones serían irreales, ya que nadie usa tales temperaturas para freir alimentos.

- Influencia del tiempo de fritura. Cuando las patatas permanecen en el medio de fritura durante un tiempo largo, la absorción del aceite es usualmente mayor que si el tiempo es menor. También, cuando la grasa se utiliza muchas veces (después de 15 a 20 frituras y debido a la disminución de volumen del aceite utilizado) el tiempo de fritura se incrementa y el alimento absorbe más grasa.

1.2.3.3. Calidad de la grasa absorbida por los alimentos.

En 1.988 Guillaumin comentaba los resultados obtenidos en un experimento en el cual se usó aceite de girasol para freir patatas. Después de las frituras se drenó el alimento frito con un papel absorbente extrayendo posteriormente la grasa de este papel. Antes y después de la primera fritura no se observaron diferencias en la composición química de los glicéridos o de los ésteres de los ácidos grasos. Después de la decimocuarta y decimoquinta fritura se observó sólo ligeras diferencias entre la grasa del medio de fritura y la absorbida por el alimento. Sin embargo, al comparar la composición de la grasa del medio y la extraída del papel se comprobó que ésta última estaba enriquecida en glicéridos y ésteres modificados. Estos resultados indicaban que donde se acumulaban los glicéridos modificados era en la superficie del alimento frito.

Figuerola (1984) utilizando ácido pentadecanóico como estándar interno, encontró diferencias en la composición de la grasa del baño de fritura y la grasa de penetración, lo que sugería una dinámica de penetración diferente para los distintos ácidos grasos.

Sánchez-Muniz y col. (1989) encontraron que la composición de la grasa extraída de patatas fritas en aceite de oliva, fue ligeramente diferente a la de los aceites que quedan en las freidoras y que el contenido de componentes polares del aceite extraído de patatas fritas fue mayor que el del aceite de las freidoras. A consideraciones similares se llegó friendo patatas en aceite de girasol de forma repetida y discontinua (Arroyo, 1991 y Sánchez-Muniz y col., 1992a).

Esta revisión se ha referido a fritura de patatas, que es el alimento tratado en esta experiencia. Indudablemente existirán otras consideraciones en el caso de otro tipo de alimentos, ya que cuando éste se frie, llega a enriquecerse en grasa dependiendo del contenido graso del alimento crudo.

Mai y col. (1978) encontraron en un estudio realizado en frituras de pescado fresco, que cuanto más alto era el contenido en grasa del pescado, menor era el intercambio de grasa entre alimento y grasa culinaria. Por el contrario, cuando el pescado tenía menos contenido en grasa, absorbía más grasa y tendía al final a tener una composición similar a la del aceite usado en la fritura.

Sánchez-Muniz y col. (1990a) en un experimento sobre la composición en ácidos grasos en sardinas crudas y fritas en aceite de oliva, de girasol y en manteca de cerdo, señalan resultados paralelos. El contenido de ácido oleico se incrementaba ligeramente en el alimento frito en el caso de la manteca y del aceite de girasol; esta elevación era más pronunciada cuando se empleaba aceite de oliva. El contenido de ácido linoléico se elevaba aunque ligeramente con el aceite de oliva y manteca, y marcadamente con aceite de girasol. Los ácidos grasos poliinsaturados, representados por el eicosapentaenoico y el docosahexaenoico bajaban en todos los casos. Por último, la relación insaturados/saturados se elevaba con el aceite de oliva y girasol, pero no con la manteca.

Resumiendo, se puede decir que cuando se frie el alimento se enriquece en grasa, y este enriquecimiento depende del contenido en grasa del alimento crudo. Según Moreiras-Varela y col. (1988), este enriquecimiento lipídico supone un incremento en el contenido energético del alimento y puede contribuir al transporte de componentes liposolubles, tales como los ácidos grasos insaturados y posiblemente las vitaminas liposolubles.

1.3. CAMBIOS EN LAS GRASAS CULINARIAS DURANTE LAS FRITURAS.

En las frituras la grasa es expuesta a la acción de diferentes agentes, los cuales causan cambios en su estructura.

Principalmente se destacan tres agentes: el agua de los alimentos, que es la causa de la alteración hidrolítica; el oxígeno atmosférico que penetra en el aceite desde la superficie de la freidora dando lugar a la alteración termoxidativa y, finalmente, la temperatura a la cual se lleva a cabo el proceso (alrededor de 180°C) la cual origina la alteración térmica.

Hay que hacer constar que los tres tipos de alteraciones pueden estar no sólo superpuestas, sino también interrelacionadas. Así, la alta temperatura tiene una gran incidencia en los productos de oxidación, favoreciendo la formación de dímeros y polímeros oxidados y no oxidados, y en la misma forma, los ácidos grasos libres originados en la hidrólisis son más susceptibles de sufrir alteración oxidativa y térmica que cuando están esterificados en el glicerol.

TABLA C - Rutas principales de la formación de compuestos de alteración en grasas alteradas.

TIPO DE ALTERACION	AGENTE CAUSANTE	COMPUESTOS RESULTANTES
Alteración Hidrolítica	Humedad	- Ácidos grasos - Monoglicéridos - Diglicéridos - Glicerol
Alteración oxidativa.	Aire	- Monómeros Oxidados - Dímeros y Polímeros oxidados. - Dímeros y Polímeros - Compuestos volátiles: (Hidrocarburos, aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos.)
Alteración térmica.	Temperatura	- Monómeros cíclicos - Dímeros y Polímeros

* Tomado de Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes (1988).

Los productos de alteración sumarizados en la tabla C, pertenecen a dos grandes grupos: los componentes volátiles que son parcialmente eliminados durante la fritura y cuya importancia está íntimamente relacionada con las características organolépticas de la grasa y del producto frito, y los componentes no volátiles, los cuales no sólo son de interés desde el punto de vista nutricional, formando parte de la dieta, sino también desde el punto de vista analítico, ya que ellos se acumulan desde el comienzo de la fritura y su nivel está relacionado con la alteración total de la grasa (Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes, 1988; Fedeli, 1988).

Paralelas a estas alteraciones básicas hay que considerar las múltiples interacciones que se establecen entre el alimento y la grasa, y que ya han sido descritas con anterioridad.

1.3.1. Alteraciones Hidrolíticas

Este tipo de alteraciones son las primeras que aparecen. Los compuestos originados inicialmente son ácidos grasos libres con formación paralela de diglicéridos, monoglicéridos y glicerol.

Según Dobarganes y col. (1986), la alteración hidrolítica se produce cuando el producto a freír tiene un elevado contenido en agua.

La deshidratación posterior del glicerol da lugar a la acroleína o propenal, de conocido poder tóxico, y los ácidos grasos libres serán el sustrato de posteriores reacciones de oxidación, en las que se originarán hidroperóxidos, (Permanyer y col., 1985).

1.3.2. Alteraciones Oxidativas

Aunque existen diferencias sustanciales entre la alteración oxidativa a baja temperatura y a alta temperatura, los datos acumulados demuestran que en ambos casos la vía principal de obtención de compuestos de alteración, incluye la formación de hidroperóxidos, (Frankel, 1985).

Es bien conocido que la autooxidación tiene lugar a través de un proceso general que envuelve 4 fases que explican toda la gama de nuevos compuestos formados y que se resúmen a continuación:

1.- Iniciación: Sustracción de un hidrógeno de un grupo metileno adyacente al doble enlace:



2.- Propagación: Reacción del radical formado con el oxígeno atmosférico con formación de peróxidos y posterior interacción de éstos con nuevas moléculas insaturadas para originar hidroperóxidos.



3.- Ramificación: Descomposición de Hidroperóxidos incrementando la concentración de radicales libres.

4.- Terminación: Eliminación de radicales del sistema para formar compuestos estables.

Mediante este proceso existen diferentes posibilidades de formación de radicales y compuestos entre las que destacan dos grupos: Monómeros oxidados y compuestos de oxidación.

Un tercer grupo de compuestos, incluye la escisión del resto acilo constituyente del triglicérido, con formación de compuestos volátiles (Frankel, 1985).

Es interesante destacar las principales diferencias que introduce la variable temperatura en tan complejo mecanismo, por su repercusión en los productos de degradación obtenidos:

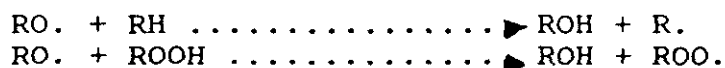
a) A baja temperatura, la velocidad de formación de los hidroperóxidos es mayor que su descomposición, que tiene lugar a través de la vía monomolecular y, por tanto, los compuestos son fundamentalmente monómeros de triglicéridos oxidados.

b) A elevada temperatura, la velocidad de ramificación de los ROOH a través de la descomposición bimolecular, es mayor que su formación. La concentración de los hidroperóxidos es prácticamente cero y los principales compuestos originados son dímeros y polímeros, ya que los radicales con posibilidad de interaccionar son glicéridos (Nawar, 1984).

Por otra parte, al acelerar la temperatura todas las reacciones de la cadena autooxidativa, la cantidad de compuestos de alteración obtenidos a temperatura elevada es mucho mayor y su distribución depende del tiempo de calentamiento.

a) Monómeros oxidados

Estos compuestos, que se obtienen en mucha menor proporción a elevada temperatura, se originan tanto mediante reacciones de propagación:



como de terminación:



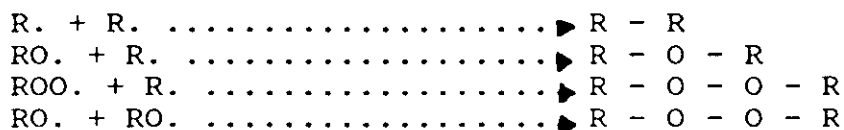
Al igual que en el caso de los dímeros y polímeros, la estructura de este grupo de compuestos es sumamente compleja.

La importancia de los monómeros oxidados, se debe a su rápida formación cuando el calentamiento es discontinuo ya que, durante el período de enfriamiento, la velocidad relativa de las fases de propagación e iniciación se invierte, predominando en la fase de ramificación la descomposición monomolecular de los hidroperóxidos.

b) Polimerización Oxidativa.

Muchos estudios han sido publicados sobre la naturaleza de los compuestos dímeros y de elevado peso molecular que se producen a elevada temperatura, (Firestone, 1963; Paulose y Chang, 1973; Miyashita y col., 1982).

La dimerización, que constituye el primer paso de la polimerización, transcurre a través de cuatro reacciones principales, que dan lugar a dímeros no polares (C-C), puente éster (C-O-C) y puente peróxido (C-O-O-C), respectivamente, (Leonard, 1975; Frankel, 1985).



La existencia de hidrógenos activos en otros puntos de la molécula, pueden continuar la reacción de polimerización, produciéndose así una mezcla de compuestos de muy diferente polaridad si se tiene en cuenta, además, que las moléculas constituyentes pueden poseer grupos polares en otros puntos de la cadena. Debido a las dificultades analíticas envueltas en el estudio de mezclas complejas de este tipo, la estructura de muchos de los compuestos, así como la influencia de las variables del proceso sobre las diferentes reacciones, permanecen aún pendientes de resolver.

Es importante señalar que aunque los dímeros y polímeros no polares (enlace C-C), se han considerado compuestos característicos de la alteración térmica en

condiciones no oxidativas, su formación es también posible a través de la vía oxidativa, siendo una de las clásicas reacciones de eliminación de radicales libres. La importancia de estos compuestos en el conjunto puede ser considerable, sobre todo si existe limitación en la disponibilidad del oxígeno como ocurre en la oxidación no forzada. En estas condiciones, la fase limitante es la propagación, mientras la reacción de iniciación que da lugar a los radicales R., se encuentra muy acelerada.

c) Componentes volátiles

Las reacciones ya citadas dan lugar a la formación de compuestos de oxidación no volátiles que tienen, como mínimo, un peso molecular similar al de la molécula de la que proceden. Un tercer grupo de compuestos originados en la alteración oxidativa se caracteriza, sin embargo, por su elevada volatibilidad y bajo peso molecular.

Los componentes volátiles originados en la oxidación a elevada temperatura, suponen sólo una pequeña parte del total de los compuestos de alteración. No obstante, su extraordinaria importancia desde el punto de vista sensorial, ha contribuido al desarrollo de estudios por parte de los más importantes grupos de trabajo en el campo de las grasas (Nawar y col., 1978; Chang y col., 1978; Frankel y col., 1981).

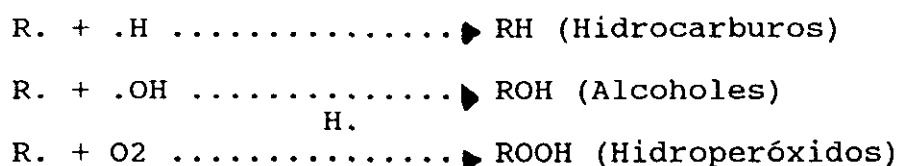
Aún cuando no existe acuerdo sobre el término componente volátil, dada la inexistencia de relación entre la volatibilidad de los compuestos orgánicos y sus umbrales de detección olfativa, en este apartado consideramos los obtenidos por escisión del resto acilo, es decir, compuestos de menor peso molecular que el del resto acilo del que proceden.

Una excelente revisión realizada por Frankel (1985), muestra que la composición cualitativa de los componentes volátiles originados, depende frecuentemente de las cadenas grasas insaturadas implicadas y que su esquema de formación se repite, ya sea utilizando como base ácidos grasos, ésteres metílicos, hidroperóxidos o triglicéridos puros.

En síntesis, los componentes volátiles se originan a partir del radical alcóxido, por escisión homolítica a ambos lados del citado radical que produce un aldehído estable:



El radical R. o R'. a su vez, dada su labilidad, puede reaccionar con otros radicales en juego para dar lugar a compuestos estables:



Estas cadenas más cortas de hidroperóxidos pueden iniciar el proceso de formación de compuestos volátiles para originar aldehídos más cortos o, por el contrario, interaccionar con otros radicales originados en el proceso global para incrementar su peso molecular.

Reacciones similares obtenidas a partir del R'., que porta el grupo carboxilo, darían lugar a ácidos, hidroxiácidos o aldehídos ácidos de cadena corta con compuestos estables cuando se oxidan ácidos grasos, aunque en el caso concreto de los triglicéridos, R' quedaría unido al glicerol formando parte de una molécula no volátil. (Peerss y Swoboda, 1979; Selke y Rohwedder, 1983).

La influencia de la temperatura en la cantidad de compuestos volátiles originados es enorme, pero la mayor significación de estos compuestos está relacionada con el mecanismo de autooxidación a baja temperatura. En efecto, aunque a baja temperatura la cantidad de compuestos de oxidación total es muy pequeña, la formación de aldehídos y cetonas de umbrales de detección muy bajos, modifica sustancialmente las características organolépticas de la grasa, siendo su principal consecuencia la aparición de rancidez. A elevada temperatura, sin embargo, la mayor parte de estos compuestos se eliminan del sistema debido a su volatilidad, y el mayor interés recae en la elevada cantidad de componentes no volátiles originados, cuyas propiedades nutritivas son desconocidas.

En resumen, en una grasa sometida a la acción de la temperatura y del oxígeno, se origina una amplia serie de compuestos diversos, volátiles y no volátiles, cuya distribución es difícil predecir y depende

fundamentalmente de la insaturación de la grasa, de la disponibilidad del oxígeno, de la temperatura, de la continuidad o discontinuidad en el calentamiento y del tiempo de tratamiento (Weiss, 1970; Fritsh y col., 1979; Gere, 1983a y 1983b; Stevenson y col., 1984).

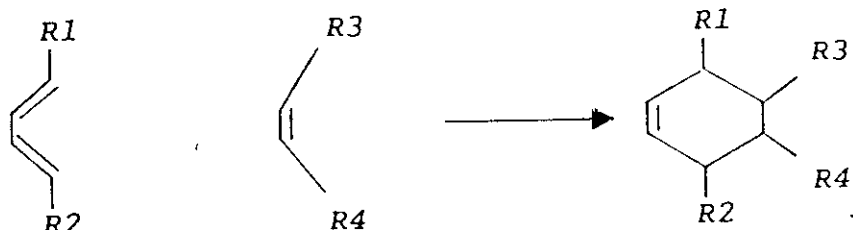
1.3.3. Alteraciones térmicas

Tres grupos de reacciones destacan en la grasa, como consecuencia de la acción de una elevada temperatura en ausencia de oxígeno:

- a) Uniones entre cadenas insaturadas de ácidos grasos que dan lugar a compuestos de polimerización.
- b) Reestructuración intramolecular con formación de monómeros cíclicos.
- c) Descomposición termolítica del triglicérido con formación de ácidos grasos, aldehidos y cetonas.

A) Formación de dímeros y polímeros.

Los principales compuestos obtenidos en la alteración térmica, son compuestos dímeros en cuya unión no participa el oxígeno, y cuya formación se explica a través de reacciones Diels-Alder, es decir, reacciones entre un doble enlace y un dieno conjugado para formar un derivado ciclohexénico tetrasustituido:



Las reacciones de polimerización que conducen a la formación de estos compuestos, han sido bien estudiadas en los ácidos grasos insaturados y exige la presencia de ácidos poliinsaturados así como su

conjugación previa (Cowan, 1961; Firestone, 1963; Otter, 1970, Leonard, 1975).

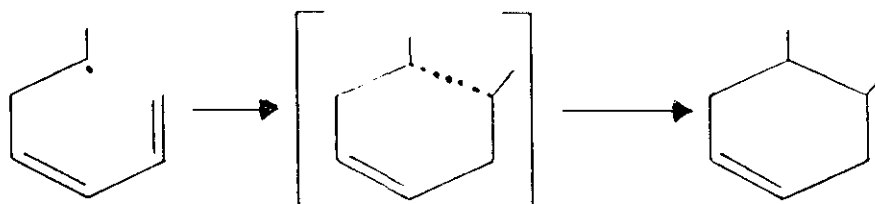
Una vez formado el dímero, la existencia de dobles enlaces disponibles en otros ácidos grasos de la molécula de triglicérido, puede dar lugar a una posterior reacción, produciendo trímeros que pueden a su vez, continuar la polimerización.

Mediante estudios similares que se refieren al ácido oleico, se ha demostrado que la reacción Diels-Alder, no es el único mecanismo posible en la polimerización térmica (Cowan, 1962). En efecto, la obtención de dímeros se explica por la formación y combinación de radicales alilo, producidos por pérdida de un hidrógeno activo adyacente al doble enlace.

La importancia de estas dos vías depende de la temperatura, de la concentración de ácidos grasos poliinsaturados y de la existencia de dobles enlaces conjugados.

B) Formación de monómeros cíclicos.

El tratamiento térmico conduce también a la formación de monómeros cíclicos a partir del linolenato de metilo y del aceite de soja parcialmente hidrogenado, como se demostró por Artman y Alexander (1969). El mecanismo por el que estos compuestos se originan parece ser que implica la sustracción de un hidrógeno en posición alílica, seguido de unión intramolecular del radical libre al doble enlace:



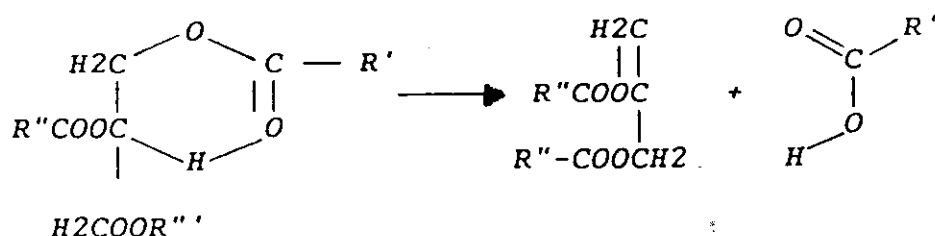
El interés por el estudio de estos compuestos, se relaciona con su pontencial toxicidad (Alexander, 1978; Grandgirard y col., 1984), pero su formación sólo es significativa en aceites con elevado contenido en ácido linolénico.

C) Reacciones termolíticas.

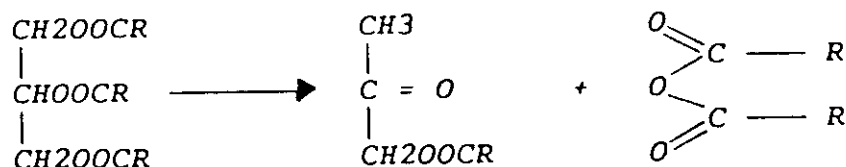
Dada la importancia mayoritaria de las reacciones que afectan a las cadenas insaturadas en el conjunto de los compuestos originados por vía exclusivamente térmica, la información sobre las reacciones termolíticas, se ha obtenido a partir de triglicéridos puros constituidos por ácidos grasos saturados.

Los productos característicos producidos en el calentamiento de estos triglicéridos, son los siguientes: series de alcanos y 1-alqueno normales, predominando el alcano (C_{n-1}), ácido graso (C_n), cetonas simétricas (C_{2n-1}), oxopropilésteres (C_n), propeno y propanodiolésteres, diglicéridos (C_n), acroleína, (CO y CO_2), siendo n el número de átomos de carbono del ácido grasos saturado (Nawar y col., 1978; Nawar, 1985a).

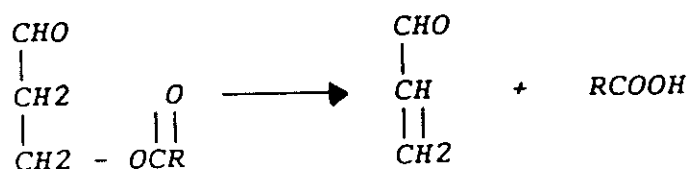
Cuantitativamente, los compuestos mayoritarios son los ácidos grasos libres, producidos por descomposición termolítica del triglicérido (Nawar, 1985b). En un sistema exento de humedad, los ésteres que poseen un hidrógeno beta en el componente alcohólico, pueden formar un anillo de seis átomos de carbono, por medio de un puente de hidrógeno. El reajuste de electrones da lugar a un ácido y a una olefina:



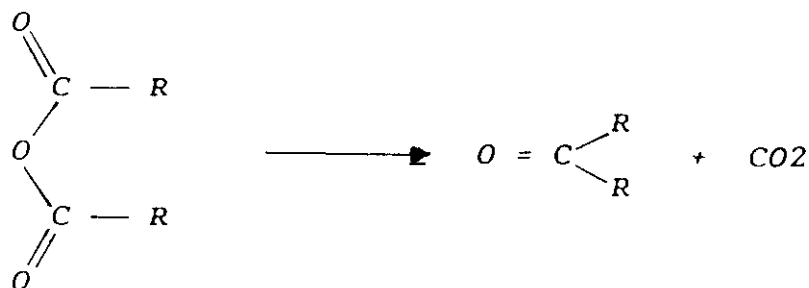
Por otra parte, la eliminación de un anhídrido ácido de la molécula de triglicérido, produce 1 ó 2 oxopropilésteres y el anhídrido ácido según:



y de la descomposición de 1 oxopropilésteres se originan acroleína y ácidos grasos:



Finalmente, la descarboxilación del anhídrido ácido puede producir la cetona simétrica:



En lo que se refiere a los compuestos volátiles, los más característicos son las series de alcanos y alquenos originados por escisión homolítica C-C a lo largo de la cadena de ácido graso. Debido a su pequeña proporción en la mezcla total de compuestos de alteración, a la baja significación sensorial de los hidrocarburos y a su eliminación de la grasa por su elevada volatilidad, han sido objeto de menor consideración (Nawar, 1985b).

1.4. EVALUACION ANALITICA DE LA ALTERACION

El incremento en el consumo de grasas que han sido empleadas en fritura y por ello, sometidas a calentamiento, ha tenido como consecuencia que distintos sectores, entre los que destacan las Administraciones Públicas y los Consumidores, estén interesados en conocer el alcance de la alteración producida en las grasas para establecer límites en su utilización.

Por ello uno de los objetivos fundamentales en el estudio de las grasas utilizadas en fritura, es encontrar métodos analíticos exactos y reproducibles que proporcionen una buena medida de la degradación producida durante la fritura.

En décadas precedentes la evaluación estaba basada exclusivamente en índices analíticos de carácter general (viscosidad, índice de peróxidos, acidez ...), relacionados con grupos de compuestos originados durante la fritura, pero sin posibilidad de establecer una relación entre la variación de estos índices y la alteración total.

El desarrollo de las técnicas cromatográficas de separación, ha abierto en los últimos años perspectivas más favorables desde el punto de vista analítico y ha permitido iniciar la puesta a punto de métodos que

evalúen la alteración de forma más directa, cuantificando los productos de alteración.

Este capítulo se ha dividido en tres apartados que responden a las tendencias más destacadas en el análisis de grasas procedentes de fritura:

- 1) Evaluación mediante índices de carácter general.
- 2) Sistemática analítica para la evaluación de la alteración total.
- 3) Cuantificación de los compuestos específicos de la alteración.

1.4.1. Índices analíticos de carácter general

El desarrollo de la alteración producida en la grasa utilizada en frituras origina una serie de cambios físicos y químicos en la grasa, algunos de ellos fácilmente observables, entre los que destacan:

- 1.- Variación de los caracteres organolépticos, caracterizado por el desarrollo de olores y sabores típicos relacionados con el tipo de alimento frito y los compuestos volátiles producidos.
- 2.- Incremento de la viscosidad y densidad como consecuencia de las reacciones de polimerización.
- 3.- Oscurecimiento atribuido a la presencia de compuestos carbonílicos insaturados ó componentes polares del alimento solubilizados en la grasa.
- 4.- Tendencia a la formación de espuma relacionada también con los productos de polimerización y sustancias anfifílicas procedentes del alimento.
- 5.- Disminución del punto de humo debido a la eliminación de componentes volátiles.
- 6.- Incremento de la extinción específica a 232 y 270 nm como consecuencia de la formación de

dobles enlaces conjugados y compuestos carbonílicos, alfa, beta insaturados.

7.- Variación en la composición de ácidos grasos caracterizada por el incremento de los ácidos saturados en relación a los insaturados, más propensos a sufrir alteración.

8.- Aumento de la acidez libre fundamentalmente debido a reacciones de hidrólisis.

9.- Disminución del índice de Iodo que tiene lugar a medida que se eliminan dobles enlaces en las reacciones de polimerización, ciclación, etc.

Todos estos cambios generales han sido utilizados rutinariamente para la evaluación de las grasas de fritura, y sus variaciones han servido para establecer diferencias en el comportamiento de distintos aceites y grasas (Morrison y Robertson, 1978; Huang y col., 1981; Plessis y Niekerk, 1981; Coll y Rueda, 1984), para analizar la influencia de distintas variables (Sanelli, 1979; Paradis y Nawar, 1981; Gere, 1982), ó, incluso partiendo de un aceite y condiciones determinadas, evaluar la correlación entre las medidas que dichos índices proporcionan (Waltking y Zmachinski, 1970; Pardum y col., 1974; Paradis y Nawar, 1981; Cuesta y col., 1991a).

Entre sus características destacan su fácil y rápida realización, no requerir equipos costosos o de difícil manejo y proporcionar resultados exactos y reproducibles, todas ellas características positivas que los hacen muy apropiados como métodos de control en industrias relacionadas con la fritura de alimentos.

No obstante, hay que tener en cuenta una exigencia mínima que debe cumplir cualquiera de ellos, y es, lógicamente, que su valor esté relacionado con la alteración producida y sólo con ella. Desde este punto de vista, los índices clásicos no están exentos de algunos de los siguientes inconvenientes:

1.- Tomar por necesidad como valor de referencia el de la grasa de partida antes de comenzar a freír.

2.- Evaluación de un aspecto muy parcial de la alteración e incluso en algún caso, no directamente relacionado con ella.

3.- Dependencia de otros factores ajenos a la alteración de la grasa y más influenciados por la solubilización de componentes del alimento.

La enumeración de los inconvenientes de estos índices, sólo pretende avisar sobre la utilización indiscriminada de los mismos y no implica, de ningún modo, la duda sobre su eficacia y utilidad en situaciones donde se demuestre su validez (Smith y col., 1986; Cuesta y col., 1991b).

Su utilidad se pone de manifiesto por las correlaciones positivas encontradas entre los mismos y los métodos que valoran los compuestos polares, los cuales están relacionados directa y específicamente con la degradación de las grasas que han sido empleadas en frituras (Cuesta y col., 1991b).

1.4.2. Evaluación de la alteración total

La medida directa de la alteración tiene la enorme ventaja de eliminar los inconvenientes de los índices clásicos, ya que, junto a la posibilidad de evaluar compuestos específicamente relacionados con la degradación, existe un claro valor de referencia para la grasa inicial, donde la cantidad de los compuestos alterados debe ser prácticamente nula.

El desarrollo de estos métodos está directamente relacionado con la mejora de las técnicas cromatográficas, como puede verse en la tabla D donde se resúmen las principales determinaciones.

TABLA D- Métodos analíticos para la cuantificación de compuestos alterados.

Determinación Analítica	Técnica Utilizada
(1) <u>Determinación Global</u>	
- Compuestos polares (Triglicéridos)	Cromatografía en columna de sílice. Cromatografía líquida.
- Material no eluido (ésteres metílicos)	Cromatografía gas-líquido
- Esteres metílicos no polares.	Cromatografía en columna de sílice. Cromatografía gas-líquido
(2) <u>Determinaciones Específicas.</u>	
- Monómeros cíclicos (ésteres metílicos)	Cromatografía gas-líquido
- Dímeros (ésteres metílicos)	Cromatografía gas-líquido
- Dímeros no polares (ésteres metílicos)	Cromatografía gas-líquido
- Polímeros (triglicéridos o ésteres metílicos)	Cromatografía líquida.

Adaptado de Gutiérrez Gozález-Quijano y Dobarganes. (1988).

El objetivo de esta evaluación es la separación de la muestra en dos fracciones, conteniendo una de ellas la parte de la grasa que queda sin alterar, mientras que en la segunda se concentran los productos de degradación. La diferencia de polaridad entre ambos grupos de compuestos constituye la base de esta separación que puede realizarse partiendo de la propia grasa, lo que sin duda simplifica la metodología analítica, o bien obteniendo previamente derivados más simples, fundamentalmente ésteres metílicos para disminuir la complejidad de la muestra.

La determinación de la alteración partiendo directamente de la grasa ha sido puesta a punto utilizando la cromatografía líquida (Aitzemuller, 1973a, 1973b, 1976 y 1988) y la cromatografía clásica en columna (Sen Gupta, 1976; Billek y col., 1978; Hernández y col., 1989).

En el primer caso el análisis se realiza en aproximadamente 20 minutos, con resultados muy reproducibles, pero exige un complicado sistema de acondicionamiento de la columna, así como de disponer de un instrumental muy complejo. Por otra parte, la obtención de resultados fiables está condicionada a un tratamiento complicado del eluido y de la columna, consistente en la eliminación del disolvente, combustión y reducción de los productos de pirólisis a metano que pasa finalmente a un detector de ionización de llama.

Por el contrario el método que utiliza la cromatografía en columna, también de alta reproducibilidad, se caracteriza por la simplicidad de los medios requeridos para su puesta a punto y ha sido propuesto por la IUPAC, para la evaluación de grasas de frituras, y más recientemente como método oficial (Ministerio de Relaciones con las Cortes y de Secretaría del Gobierno, 1989). Dicho método se describirá detenidamente en Material y Métodos (Apartado 3.3.3.2.1.).

En cuanto a los métodos de evaluación total de la alteración, partiendo de los ésteres metílicos, cabe destacar el semimicrométodo desarrollado por Guillaumin (1973), para la determinación de especies químicas nuevas mediante cromatografía en columna de alúmina, obteniéndose distintas fracciones eluidas con disolventes de polaridad creciente y la determinación de compuestos no eluidos en cromatografía gas líquido (Waltking, 1975). No obstante, la reproducibilidad de estos métodos que parten de una pequeña cantidad de muestra, es muy inferior a la de los procedimientos descritos anteriormente.

Por ello es interesante la modificación recomendada por la IUPAC (Dobarganes y col., 1984) y la anteriormente citada en relación a los ésteres metílicos (Dobarganes y col., 1984; Hernández y col., 1989). Una vez llevada a cabo la transesterificación de la grasa y la elección del disolvente adecuado, es posible medir cuantitativamente los ácidos grasos que han sido alterados en el proceso de fritura, con los mismos valores de reproducibilidad que la determinación de la cual procede.

La principal diferencia entre ambos métodos es que, utilizándose la grasa se obtiene una medida de la alteración total de los triglicéridos, mientras que si determinamos los ésteres metílicos, cuantificamos solo la alteración producida en los ácidos grasos de estos triglicéridos.

Hernández y col., (1989) indican, no obstante una alta correlación entre los valores obtenidos para la fracción de triglicéridos no polares y para la fracción de ésteres metílicos.

Diferentes autores han señalado la especificidad de la medida del componente polar para determinar la alteración de los aceites de fritura. Así Ancín (1991) señala que en su experimento realizado con aceite de oliva y en el que se determinan diferentes índices físicoquímicos: índice de acidez, índice de iodo, índice de peróxidos y el componente polar, éste último es el más decisivo por apreciar los cambios producidos en el calentamiento del aceite de oliva. Fritsch (1981) opina que la determinación del componente polar total es uno de los mejores índices para comprobar la alteración de las grasas de fritura.

Según Castellón (1989) la determinación de los ésteres metílicos polares alterados, frente a la de los triglicéridos polares supone obviar la sobrevaloración en que se incurre en el segundo método del componente polar. Además indica las ventajas del análisis de los ésteres metílicos a temperatura ambiente frente al análisis de los ésteres metílicos polares obtenidos por metilación en caliente y utilizando cromatografía en columna con gel de sílice: Este método supone más rapidez, economía de reactivos, integridad de los compuestos alterados, posibilidad de automatización, si bien se contrarresta con menor exactitud y la necesidad de un cromatografo de gases.

Cuesta y col. (1991b) estudiaron la alteración de un aceite de oliva durante 15 frituras sucesivas y discontinuas de patatas analizando los distintos índices físico-químicos (Índice de refracción, color, peróxidos,

iodo y medida espectrofotométrica a 270 nm) y determinando la concentración de compuestos polares encontraron que los coeficientes de correlación entre los distintos índices analíticos y el % de los ésteres metílicos no polares fueron mayores que los obtenidos con el % de triglicéridos no polares, destacando la correlación existente entre los índices de refracción y calor con el % de ésteres metílicos no polares. No obstante, también los coeficientes de correlación entre los distintos índices analíticos y el número de fritura, también era elevado.

1.4.3. Cuantificación de los compuestos específicos de la alteración.

Un tercer nivel de evaluación de las grasas termoxidadas, está relacionado con los procedimientos complejos que incluyen el fraccionamiento y el análisis estructural de los productos de alteración, cuyo objetivo es obtener una información completa y detallada de la distribución de los compuestos degradados. Esta información permite relacionar la incidencia de los diferentes grupos de compuestos sobre los efectos fisiológicos y para desarrollar nuevos métodos analíticos más simples que puedan servir para controlar la alteración. Los sistemas más clásicos están basados en la diferencia de solubilidad (Privett, 1959) o en la distinta capacidad de los compuestos para formar aductos con la urea (Boelhower y col., 1967).

La cuantificación de compuestos específicos de la alteración como los monómeros cíclicos y los compuestos poliméricos, supone un gran avance en la caracterización de las grasas de fritura.

Así la importancia de los monómeros cíclicos que se originan por ciclación intramolecular de ácidos grasos poliinsaturados, es debida tanto a su toxicidad potencial como a su especificidad respecto a la alteración térmica.

Su determinación se realiza a partir de los ésteres metílicos, mediante cromatografía gas-líquido, previa hidrogenización de la muestra, incluyendo la mayoría de los métodos un paso intermedio de aduoción con urea (Gere y col., 1984; Potteau y col., 1970), ó cristalización a baja temperatura (Meltzer y col., 1981) para eliminar la mayor parte de los ésteres metílicos no alterados y conseguir una concentración de los compuestos de interés. No obstante, debido a la naturaleza química aún desconocida de algunos de los monómeros cíclicos originados a su baja concentración en la muestra total y

a la complejidad de la metódica, la exactitud y reproducibilidad del método, son discutidas (Grandgirard y Julliard, 1983). Aunque su formación es a partir de ácidos grasos con 3 ó más dobles enlaces, esta determinación es importante en la evaluación de aceites que contengan cantidades significativas de ácido linolénico.

Para la determinación de compuestos poliméricos, se utiliza preferentemente la cromatografía de exclusión sobre gel, bien directamente a partir de la grasa (Aitzemuller y Guhr, 1976; Gomes, 1983; Christopoulou y Perkins, 1986) ó de los ésteres metílicos (Perkins e Iwaoka, 1973; Inove y col., 1970).

Aún cuando es una determinación de gran interés, es difícil conseguir una buena separación de estos compuestos, por constituir un grupo poco homogéneo, tanto en peso molecular como en polaridad (Firestone, 1963).

También merece ser destacada la técnica puesta a apunto por Gere (1983b), donde a partir de triglicéridos, se desarrollan dos secuencias independientes.

Finalmente, merece la pena comentar el único sistema analítico que consigue cuantificar combinando las técnicas cromatográficas de columna y gas-líquido y el tratamiento de la muestra de grasa como tal, con el análisis de los ésteres metílicos (Dobarganes y Pérez-Camino, 1988), utilizando como base los métodos analíticos más reproducibles. En una primera separación, se cuantifica la alteración total, partiendo directamente de la grasa y en una posterior separación de los ésteres metílicos obtenidos a partir de la fracción alterada, se determinan los ácidos grasos no alterados, ácidos dímeros no polares y los compuestos de oxidación poliméricos. Nuestro grupo se encuentra en la actualidad en la cuantificación de diferentes compuestos específicos de alteración que se producen durante la fritura.

1.5 PAPEL DEL HIGADO EN EL METABOLISMO LIPIDICO Y LIPOPROTEICO.

1.5.1. Metabolismo Lipoproteico

Los lípidos son unas sustancias que tienen como propiedad común el ser solubles en solventes orgánicos y pobremente solubles en agua. Por esta última razón, no pueden circular libremente por la sangre, tienen que unirse a proteínas formando agregados que se conocen con el nombre de lipoproteínas.

Estas lipoproteínas se clasifican según su densidad de flotación en:

- 1- Quilomicrones.
- 2- VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad
- 3- LDL: lipoproteínas de baja densidad.
- 4- HDL: lipoproteínas de alta densidad.

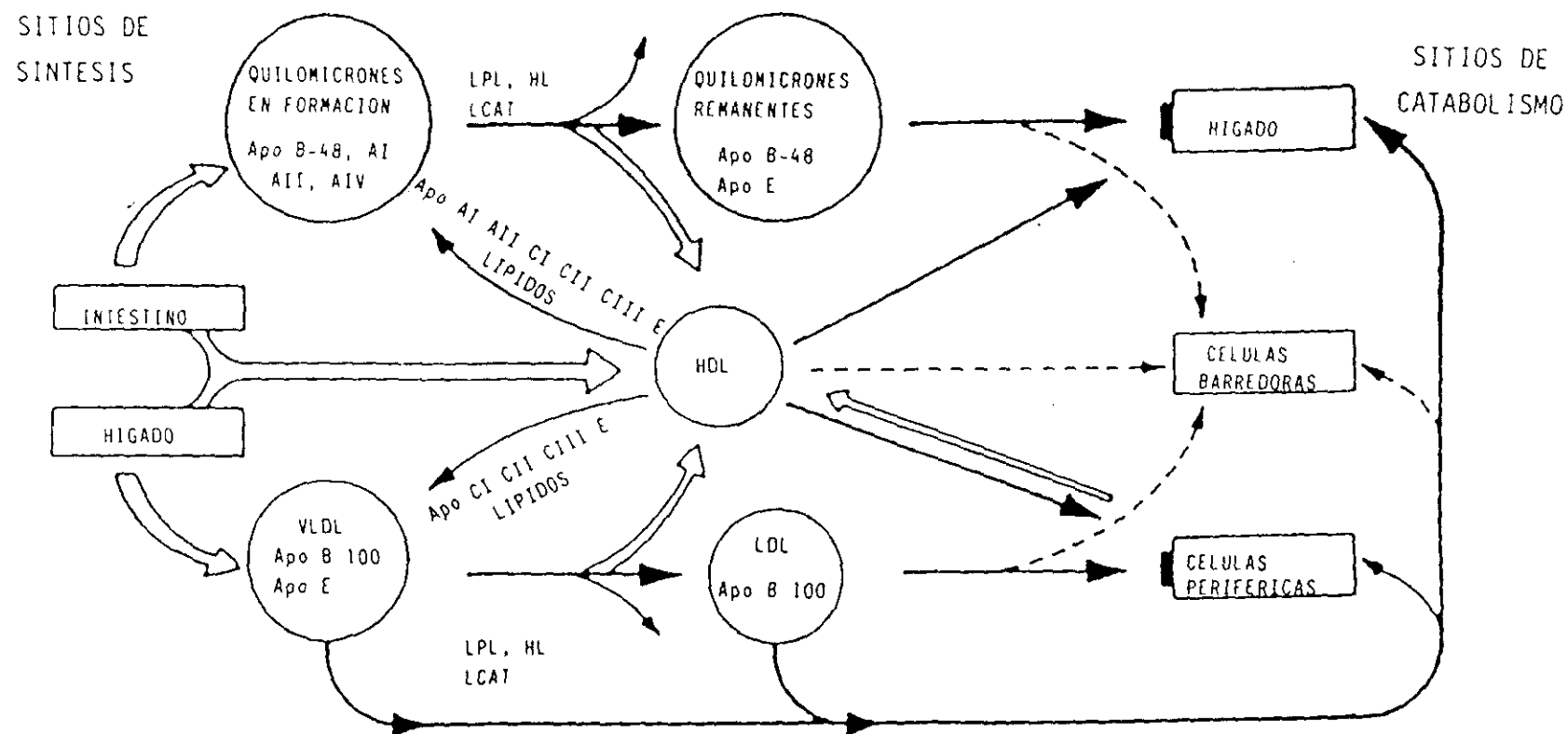
En la figura 1, se muestra una visión conceptual del metabolismo lipoproteico, donde se muestra la importancia del hígado en dicho metabolismo.

Los quilomicrones vehiculizan los lípidos de origen alimentario, siendo su función principal la de transportar ácidos grasos a los puntos donde deben ser utilizados o almacenados. Se forman en el intestino a partir de los ácidos grasos y el colesterol dietarios, los cuales después de su absorción intestinal son reesterificados para formar triglicéridos y colesterol esterificado. Ambos tipos de lípidos se unen a la apoproteína B-48 sintetizada por el intestino (Kane y col., 1980), a varias apoproteínas apo-A y lípidos polares (fosfolípidos y colesterol) formando los quilomicrones. Estos quilomicrones pasan de linfa a sangre adquiriendo en este paso apo C y apo E de las HDL (Havel y col., 1973; Green y col., 1979).

En la sangre, a su paso por el tejido adiposo y músculo, la lipoproteín-lipasa (LPL) activada por la apo C-II cataliza la hidrólisis de los triglicéridos de los quilomicrones (Fielding y Havel, 1977), produciendo ácidos grasos libres, glicerol y residuos de quilomicrones (quilomicrones remanentes).

Las principales zonas del organismo en que existe lipoproteín-lipasa son tejido adiposo, músculo esquelético, miocardio y glándula mamaria.

FIGURA N° 1. VISION CONCEPTUAL DEL METABOLISMO DE LAS LIPO-
PROTEINAS EN INDIVIDUOS SANOS.



La lipoproteín-lipasa de corazón y músculo esquelético puede hidrolizar triglicéridos aunque estos se encuentren a bajas concentraciones (Fielding, 1976). Tras una ingesta de grasas el enzima muscular estaría saturado y podría actuar la lipoproteín-lipasa del tejido adiposo de baja afinidad con funciones de almacenamiento.

Estos quilomicrones que pierden sus triglicéridos quedan con un exceso de material de superficie, pudiendo originar partículas con características semejantes a HDL nacientes (Tall y col., 1977) o ser transferida a HDL3 con formación de HDL2 (Patsh y col., 1978).

Los quilomicrones remanentes pueden ser rápidamente captados de la circulación por receptores hepáticos y de otras células, que reconocen las apo E de la superficie de dichas partículas (Canella y Cooper, 1979; Hui y col., 1981).

Los componentes lipídicos de las remanentes pueden volver a sangre desde el hígado incorporándolos a otras lipoproteínas (Sherrill y Dietschy, 1977).

Según Kane y col. (1980) las VLDL son sintetizadas mayoritariamente en el hígado, a partir principalmente de apo B-100 (de síntesis hepática) y de ácidos grasos. Estos ácidos grasos pueden tener varios orígenes:

- Ácidos grasos no esterificados que llegan al hígado vehiculizados por la albúmina plasmática y proceden de la dieta o de la lipólisis en los adipocitos.

- Ácidos grasos de triglicéridos de las HDL y de otras partículas.

- Ácidos grasos, especialmente saturados, sintetizados de "novo" a partir de acetato.

Los ácidos grasos no secretados al plasma en forma de lipoproteínas serán oxidados a dióxido de carbono y cuerpos cetónicos.

Los triglicéridos sintetizados en el hígado son almacenados con fosfolípidos, colesterol y apo proteínas y secretados como VLDL en la circulación (Janero y col., 1984).

Higgins y Fieldsend (1987) han detallado el papel del aparato de Golgi y retículo endoplásmico en la formación, empaquetamiento y secreción de las VLDL por el hígado. También describen la participación de sistemas enzimáticos en la formación de los fosfolípidos de estas VLDL.

Después de su secreción las VLDL nacientes adquieren apoproteínas. En este proceso de maduración, las HDL aportan apo C para que las VLDL sean degradables (Chajek y Eisenberg, 1978) y contribuyen a la esterificación del colesterol de las partículas VLDL (Nestel y col., 1979). Este último proceso ocurre por un intercambio de colesterol y ésteres de colesterol inter - viniendo el enzima Lecitín-Colesterol-Acil-Transferasa (LCAT), el complejo de transferencia de ésteres de colesterol (Ha y col., 1981) y la proteína transportadora de triglicéridos (Rajaram y col., 1980). En la rata, no existen estos complejos y, por lo tanto, existe un menor intercambio de ésteres de colesterol entre las HDL y las VLDL (Barter y Lally., 1978).

El metabolismo de las HDL es central y fundamental en el transporte del colesterol plasmático (Barter. y Lally, 1978).

Una gran proporción de colesterol que entra en el plasma es convertido a ésteres de colesterol e incorporado a las HDL.

A continuación la actividad del transportador proteico lipídico (TPL) promueve una redistribución de los ésteres de colesterol desde la HDL a otras fracciones lipoproteicas plasmáticas. Estos transportadores representan la mayor vía por la cual los ésteres de colesterol llegan a incorporarse a las VLDL y LDL del plasma humano. Dado que las VLDL son catabolizadas a LDL, el producto final del proceso transportador es la entrega de ésteres de colesterol a LDL y de esta manera se regula la captación por aquellos tejidos que poseen los receptores apropiados. La intensidad de este transporte, puede influenciar en la intensidad de formación de lipoproteínas. Así estos autores han observado que los transportadores (Transfers) de los ésteres de colesterol desde HDL a las proteínas séricas transportadoras de triglicéridos "in vitro" aumentan la reactividad de las HDL con la LCAT. De la misma manera el incremento de esta reactividad de la HDL con LCAT aislada de individuos con Hipertrigliceridemia, es una consecuencia aparente del menor tamaño de partículas de las HDL en estos individuos.

Sin embargo en ratas las cuales carecen casi totalmente de TPL, contienen unas HDL considerablemente más grandes que las del plasma humano (Ho y Mónaco 1985). Por tanto el TPL parece mostrarse como un regulador del tamaño de partículas HDL.

A continuación se citan algunas funciones importantes de las apoproteínas en el metabolismo de las VLDL hepáticas en rata:

- Cofactores de la LCAT (Soutar y col., 1975)
- Regulación estimulación de la lipólisis de triglicéridos con la adición de apo C-II (La Rosa y col., 1970; Breckenridge y col., 1978).
- Inhibición del aclaramiento hepático prematuro de VLDL sin degradar con la apo C-III (Kraus y col., 1973; Shelburne y col., 1980; Wang y col., 1985). Así, la actividad de la lipoproteín-lipasa sobre las partículas VLDL parece depender de la relación apo C-II/apo C-III de la misma (Carlson y Ballantyne, 1976).
- Aclaramiento hepático de VLDL mermadas en triglicéridos y apo C (VLDL remanentes) por un receptor hepático que reconoce la apo E (Sherill y Dietschy, 1977). Las VLDL normales no interaccionan con los receptores apo B,E específicos (Gianturco y col., 1983) presente en la mayoría de las células. Probablemente, la apo E presente en la VLDL impide la expresión de los determinantes de unión a receptores de la apo B (Bradley y col., 1984). La apo C actuaría de forma similar sobre los determinantes de unión de apo E. Shelburne y col. (1980) comprobaron que la presencia de apo C impedía la unión de la partícula a receptores específicos. De esta manera, las VLDL, tras la hidrólisis de sus triglicéridos y transferida su apo C, podría interaccionar con los receptores hepáticos apo E completando su transformación en LDL, con pérdida de apo E y liberación de los determinantes de unión de la apo B (Bradley y col., 1984), por lo que las LDL se podrían unir a los receptores que reconocen la apo B (Anderson y col., 1976).

En plasma las VLDL pueden seguir dos vías metabólicas dependiendo de su tamaño. Así las VLDL de gran tamaño son atacadas por la lipoproteín-lipasa, dando residuos o remanentes de VLDL que posteriormente serían captadas por el hígado y catabolizadas. Estas VLDL no darían lugar a la formación de LDL.

Sin embargo, las VLDL de menor tamaño que principalmente proceden del hígado conducen a la formación de LDL.

En el proceso de transformación de las VLDL en LDL (Gómez, 1988) interviene la lipoproteín-lipasa endotelial degradando los triglicéridos a ácidos grasos libres, en este proceso interviene la apo C-II como cofactor. Durante este proceso de degradación el exceso

de material de las VLDL es transferido a las HDL. Al disminuir más rápidamente el contenido de apo C-II que de apo C-III, llega un momento en el que las VLDL ya no son degradables por la lipoproteín-lipasa. Estas VLDL residuales recibe el nombre de lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) (Streza y col., 1977). Las IDL contienen cantidades reducidas de triglicéridos y conservan la mayor parte de la apo E inicialmente presente en las VLDL. La vida media de las IDL es muy corta, siendo transformada en LDL por degradación de sus triglicéridos y eliminación de la apo E.

En la transformación de IDL en LDL parecen intervenir por una parte la vía hepática receptor dependiente (apo E, apo B, E) (Brown y col., 1983), y por otra la vía extrahepática. Lo que sí parece seguro, es la intervención de la triglicérido-lipasa en este último proceso (Rubinstein y col., 1985) .

Uno de los aspectos que más diferencian el metabolismo lipoproteico en el hombre y en la rata es la formación de LDL. Así en humanos la mayor parte de las VLDL, si no, toda, es convertida en LDL (Smith y col., 1978), permaneciendo la apo B-100 en el complejo lipoproteico durante su transformación. En la rata, la apo B es aclarada de la circulación por las células hepáticas. La velocidad de desaparición es muy rápida y solo el 10% de apo B aparece en IDL y posteriormente en LDL. Esto explicaría los bajos niveles de LDL, que se encuentran en rata y que contribuyen a que este animal sea resistente a la hipercolesterolemia.

Se ha señalado la síntesis directa de LDL por el hígado en animales alimentados con colesterol (Dolphin, 1981) y en pacientes hipercolesterolémicos (Kissebah y col., 1984), situación no descrita en animales normales (Guo y col., 1982).

En el hombre, las LDL, son las mayores transportadoras de colesterol hacia los tejidos (Parks y Bullock, 1987), los cuales captan dichas lipoproteínas en virtud de mecanismos específicos dependientes de un receptor apo B-100 apo E o mediante pinocitosis (Brown y Goldstein, 1984).

Mediante el mecanismo de captación específico de las LDL se regula la síntesis endógena de colesterol, se activa el enzima acil-colesterol-acil-transferasa y se regula la síntesis de receptores específicos para LDL (Brown y Goldstein, 1984), a estos aspectos nos referiremos más adelante.

Las HDL son las lipoproteínas más pequeñas y constituyen un grupo muy heterogéneo de partículas. Son

lipoproteínas muy ricas en apoproteínas, siendo la más abundante la apo A-I.

Las HDL intervienen en el transporte inverso del colesterol (Miller y Miller, 1975; Van Tol, 1989), ya que, transportan el colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado para su excreción o degradación en forma de ácidos biliares. En la figura 2 se muestra una sinopsis del transporte inverso del colesterol. Además, el aclaramiento de triglicéridos del plasma está relacionado con los niveles plasmáticos de HDL (Kekki, 1980).

Según Alpers y col. (1985), en hígado e intestino delgado se producen las HDL nacientes o inmaduras, pobres en ésteres de colesterol. Posteriormente estas HDL nacientes alcanzan los depósitos tisulares de colesterol y por influencia del enzima LCAT este colesterol es esterificado y situado en el centro de las HDL, formando las HDL maduras.

Es decir, en este proceso las HDL, captarán colesterol de las membranas celulares y del interior de determinadas células, intercambiando lípidos y apoproteínas. Las HDL irán disminuyendo progresivamente en densidad y tomarán las formas que se han denominado como HDL_n, HDL₃, HDL₂, y HDL (Nichols y col., 1981).

Schmitz y col., (1985) demostraron que las HDL que contienen apo A-I son capaces de unirse a receptores de macrófagos y otros tipos de células. Tras su unión a receptores, las HDL serían internalizadas mediante un sistema que no interacciona con lisosomas, captando colesterol no esterificado del citoplasma celular y resecretadas como una forma de HDL más rica en colesterol. La expresión celular de este tipo de receptores estaría regulada por su contenido en colesterol.

Tabas y Tall (1984) sugieren que la captación de colesterol por las HDL es un proceso en parte relacionado con las características físicoquímicas de estas partículas y en parte con el receptor de apo A-I antes mencionado. Este proceso de captación parece quedar restringido a las formas menos densas de HDL (HDL_n y HDL₃), mientras que las formas más densas interaccionan preferentemente con las otras lipoproteínas (Oram y col., 1981).

En la figura 3 se representa la relación entre la degradación de las lipoproteínas ricas en triglicéridos y la conversión de HDL₃ a HDL₂.

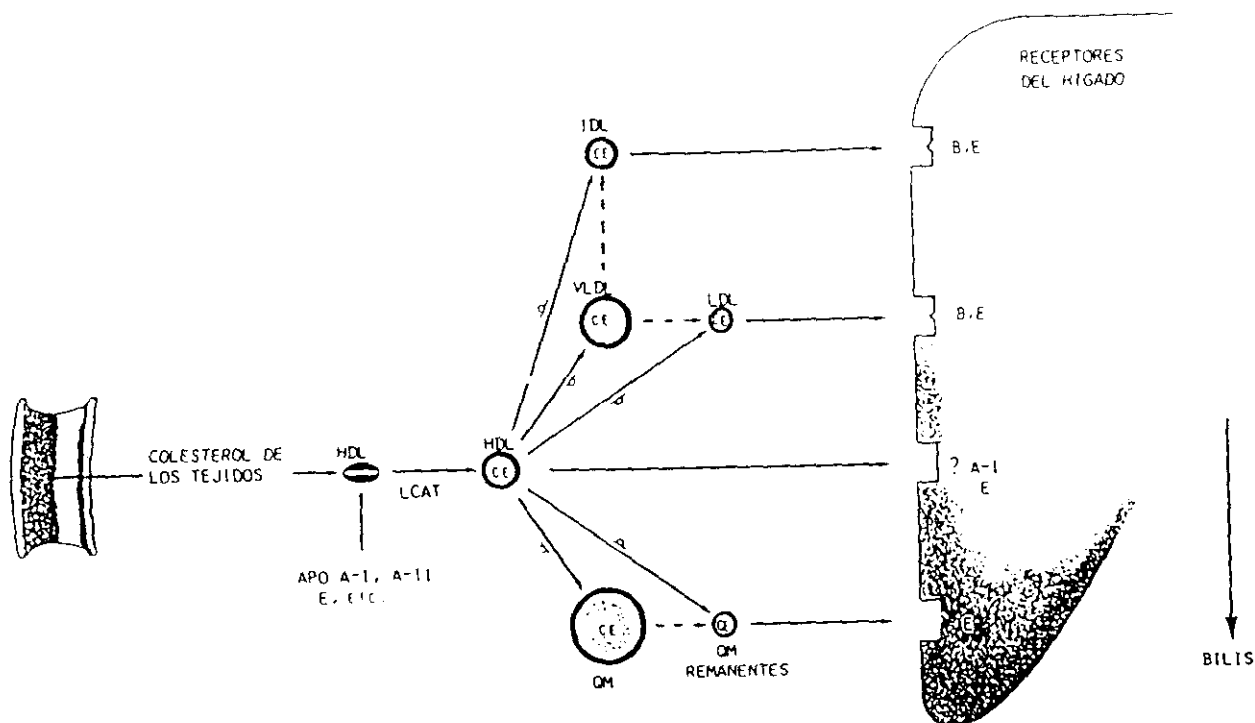


FIGURA N° 2. CONCEPTO DEL TRANSPORTE INVERSO DEL COLESTEROL

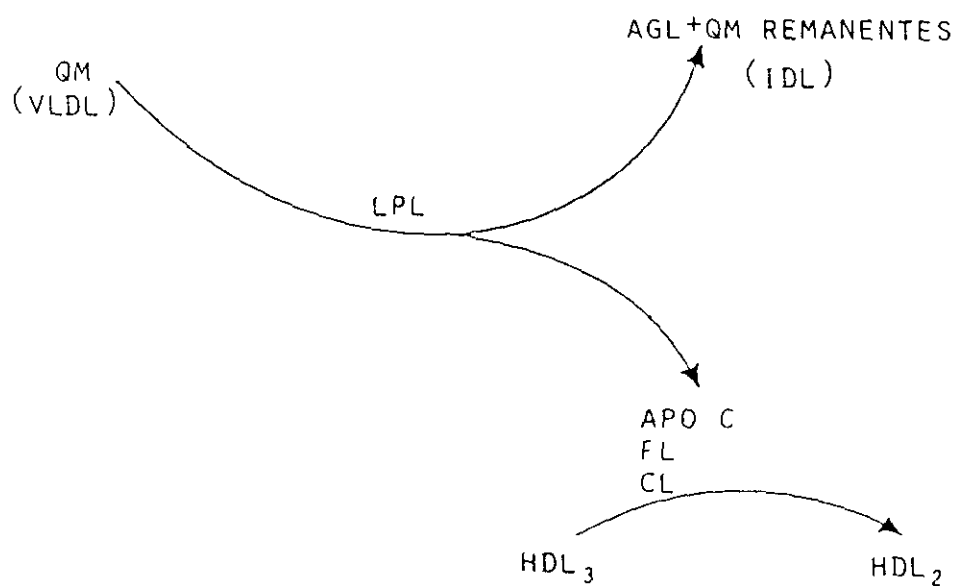


FIGURA N° 3. RELACION ENTRE LA DEGRADACION DE LAS LIPOPROTEINAS RICAS EN TG Y LA CONVERSION DE HDL₃ EN HDL₂

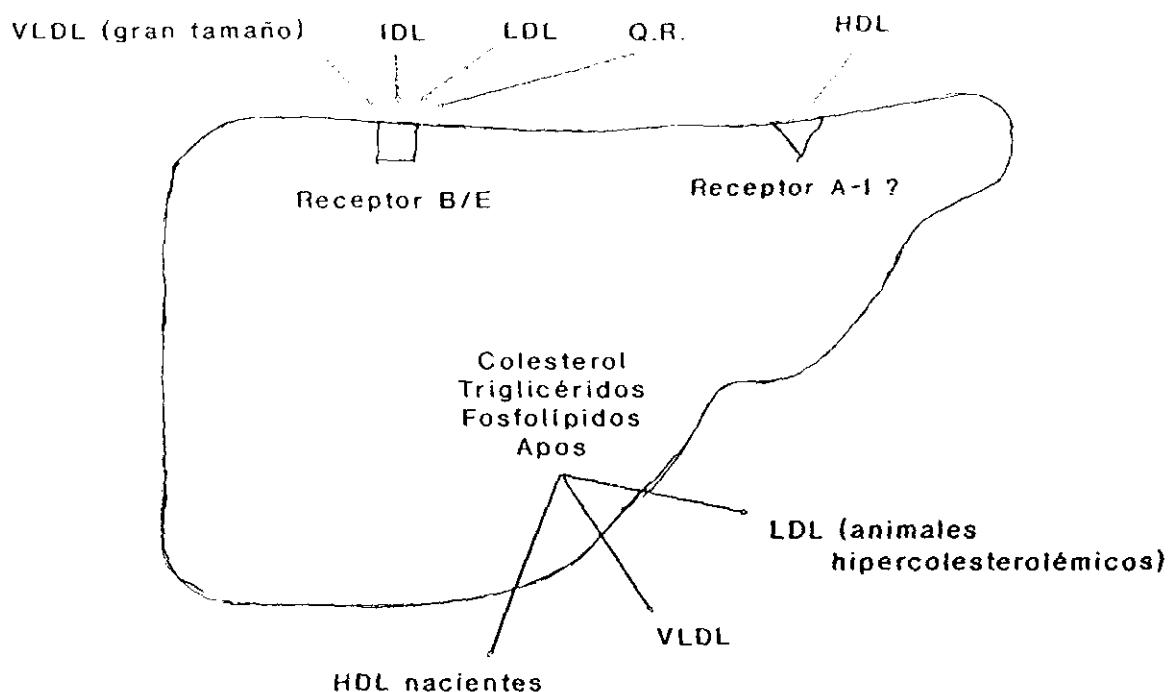
Durante la lipólisis catalizada por la LPL, se forman partículas discoidales de HDL (HDL nacientes) constituidas por una doble capa lipídica (fosfolípidos y colesterol libre, principalmente) asociada con apo A. El hígado e intestino vierten a la circulación plasmática HDL_n y la LCAT va esterificando el colesterol libre tomando la partícula forma esférica y transformándose en HDL₃. A medida que las HDL, van incorporando Apo C, fosfolípidos y colesterol libre, liberados durante la lipólisis de las lipoproteínas ricas en triglicéridos van aumentando su tamaño y disminuyendo su densidad, se convierten en HDL₂ (figura 3). La velocidad de reacción de la lipólisis es el determinante principal de la concentración plasmática de HDL₂ y HDL total, como lo indica la alta correlación positiva existente entre la actividad de la LPL y la concentración de HDL₂ o HDL total (Nikkila y col., 1978a).

Las HDL₃ actúan también como aceptores de colesterol libre las membranas celulares de los tejidos periféricos, cumpliendo la importante función de permitir el transporte de colesterol desde estos tejidos hasta el hígado para su eliminación. La LCAT contribuye a la conversión de HDL₃ en HDL₂ al ir esterificando el colesterol libre. Las HDL₂ tienen muy baja afinidad como aceptores del colesterol de los tejidos a diferencia de las HDL₃. El catabolismo final de las HDL, como HDL₂ se realiza principalmente en el hígado, único órgano capaz de eliminar colesterol del organismo en cantidades significativas, mediante su transformación en ácidos biliares. En esta hidrólisis interviene la lipasa endotelial hepática (Shirai y col., 1981).

Se ha propuesto que la función fisiológica de la lipasa hepática es la degradación de los triglicéridos de la HDL₂. La acumulación de HDL₂ ricas en triglicéridos originaría un continuo intercambio de colesterol esterificado y triglicéridos entre la HDL₂ y las partículas ricas en triglicéridos que son transferidos normalmente a HDL (Nikkila y col., 1978b).

La concentración plasmática de HDL está regulada por la velocidad de entrada al plasma de HDL nacientes procedentes del hígado, la actividad de LDL en los capilares periféricos y la actividad de la lipasa endotelial hepática.

FIGURA N° 4. PAPEL ESQUEMATICO DEL HIGADO EN EL METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEINAS



Finalmente, las HDL cargadas de colesterol (HDL2 y HDLc) serían eliminadas por el hígado en un proceso que parece ser receptor dependiente. No está claro, si este proceso de eliminación se realiza por reconocimiento de la apo E ó depende de receptores hepáticos específicos para apo A-I (Rifici y Eder 1984).

En resumen, el hígado es el mayor lugar de catabolismo de los ésteres de colesterol y de los fosfolípidos de las HDL y otras lipoproteínas (Stein y col., 1983).

El hígado es, por lo tanto, primordial en el metabolismo del colesterol. Por un lado, capta quilomicrones remanentes, VLDL, IDL, LDL y HDL y, por otro, sintetiza colesterol y otros lípidos. La síntesis de colesterol endógena depende entre otros factores del colesterol dietario, aspecto al que nos referiremos en el punto siguiente.

1.5.1.1. Colesterol

Como se ha descrito en el apartado anterior, el hígado juega un papel vital en la eliminación del colesterol sérico al captar por diferentes mecanismos las lipoproteínas plasmáticas.

Una vez el colesterol en el hígado puede ser esterificado o puede emplearse en la producción de ácidos biliares. Además en el hígado puede ocurrir la síntesis de colesterol o su reutilización para la síntesis de VLDL Y HDL como ya se ha descrito.

1.5.1.1.1. Síntesis

En el animal maduro el hígado es el lugar más activo en la biosíntesis del colesterol.

En 3 grupos de reacciones puede resumirse la colesterogénesis:

1) Conversión del acetil coenzima A (CoA) en Beta-hidroxi-metil-glutaril-coenzima A (HMG Co A). Los intermediarios en esta reacción derivan del acetil Co A y de la oxidación de los ácidos grasos. El paso determinante en la biosíntesis del colesterol es la reducción del HMG Co A a mevalonato por acción de la HMG CoA reductasa.

2) Conversión de mevalonato en escualeno. Una pequeña cantidad de mevalonato puede ser convertido mediante un mecanismo desconocido en ácidos grasos y dióxido de carbono (Edmond y Popjak, 1974).

3) Conversión de escualeno en colesterol. Estas reacciones son catalizadas por enzimas ligados a membranas. En este último paso proteínas transportadoras de esteroides aceleran el proceso al facilitar la solubilización de estos esteroides en el citosol (Zakim, 1982).

Varios son los factores descritos que pueden regular la síntesis hepática de colesterol. Algunos de estos factores se resumen en el cuadro adjunto. De entre todos estos factores destacaremos, por el planteamiento experimental de esta memoria: los ácidos grasos en las dietas.

Así según Gould y col. (1959), el colesterol libre celular es un regulador directo de la biosíntesis de colesterol.

Por otro lado, Goh y Heimberg (1977) describen que los ácidos grasos libres estimulan la actividad de HMG-CoA-reductasa en hígado perfundido. Esto puede ser explicado por el efecto de los mismos en la secreción de VLDL, ya que el colesterol libre es necesario para la formación de estas lipoproteínas. Así el aumento en la secreción de VLDL aumenta las pérdidas de colesterol por las células y hay en compensación un incremento en la síntesis del mismo.

**FACTORES QUE REGULAN LA SINTESIS HEPATICA DE COLESTEROL.
(BORTZ, 1973)**

AUMENTAN LA SINTESIS

- Colestiramina
- Alimentación grasa
- Infusión de ácidos grasos
- Corticosteroides.
- Agentes Adrenérgicos.
- Glucagón.

DISMINUYEN LA SINTESIS

- Alimentación con coles-
terol.
- Alimentación con ácidos
biliares.
- Clofibrato.
- Acido Nicotínico.
- Inhibidores de la sínte-
sis de proteínas.

Las sales biliares son un producto catabólico del colesterol y su síntesis está sujeta a control tipo feedback negativo (Shefer y col., 1969). Así, el aumento del retorno de sales biliares al hígado disminuye el catabolismo del colesterol.

Las sales biliares, por otro lado, inhiben la HMG-CoA-reductasa (Hamprecht y col., 1971). Aunque los datos obtenidos in vivo (Nervi y Diettschy, 1978) y en hígados perfundidos (Cooper, 1976) sugieren que esto no sucede en el hígado intacto y que la mayor parte de los efectos de las sales biliares en la síntesis de colesterol pueden ser debidos a otros aspectos de la homeostasis del mismo, por ejemplo en su absorción.

1.5.1.1.2. Esterificación.

La presencia de colesterol esterificado en el hígado parece ser controlada por el enzima Acil Coenzima A-colesterol Acil Tansferasa (ACAT), que contribuiría a disminuir el incremento de colesterol sérico.

Según Eisenberg y Levi (1976) la formación de ésteres de colesterol está relacionada con el aclaramiento del exceso de colesterol libre y lecitina del suero.

Norum y col. (1983) opinan que la variación en la disponibilidad de colesterol libre regula la actividad del enzima ACAT.

La regulación de este enzima ha sido estudiada en diversidad de tejidos, incluyendo hígado de rata y humano

(Goodman y col., 1964; Spector y col., 1979; Erickson y Cooper, 1980 y Erickson y col., 1980). Este enzima se localiza originariamente en el retículo endoplásmico, y de forma más abundante en el retículo rugoso.

La reacción enzimática utiliza colesterol libre de la membrana y acil Co A de ácidos grasos para obtener ésteres de colesterol y Coenzima A libre. Este enzima tiene preferencia por ciertos ácidos grasos. El orden de preferencia en la rata es oleato>palmitato>estearato>linoleato. Esto determina la composición de los ésteres de colesterol formados in vivo (Zakim, 1982).

Parece que sólo una determinada cantidad, quizá el 4%, del colesterol en el retículo endoplásmico está disponible para la esterificación por el enzima. A pesar de todo, parece ser que cambios en la cantidad de colesterol en las membranas pueden ser importantes para determinar la cantidad de colesterol que puede ser esterificado.

Este enzima responde a la manipulación dietética, así se observa aumento en la actividad del mismo después de alimentación con colesterol o ayuno.

La hidrólisis de los ésteres de colesterol es catalizada por dos enzimas: uno encontrado en lisosomas que hidroliza los ésteres de colesterol que llegan al hígado como componentes de las lipoproteínas y que se denomina colesterol estearasa lisosomal o ácida, requiere un pH óptimo de acción bajo y puede ser lípidos (Deykin y Goodman, 1962). El otro enzima, asociado a membrana, hidroliza los ésteres de colesterol formados por la reacción catalizada por la ACAT, con un pH óptimo de acción neutro.

1.5.1.1.3. Formación de sales biliares.

Otros dos procesos importantes en el metabolismo del colesterol se realizan únicamente en el hígado:

- La síntesis de sales biliares, que es la mayor vía catabólica de esteroides.
- La eliminación de colesterol con la secreción directa del mismo en la bilis.

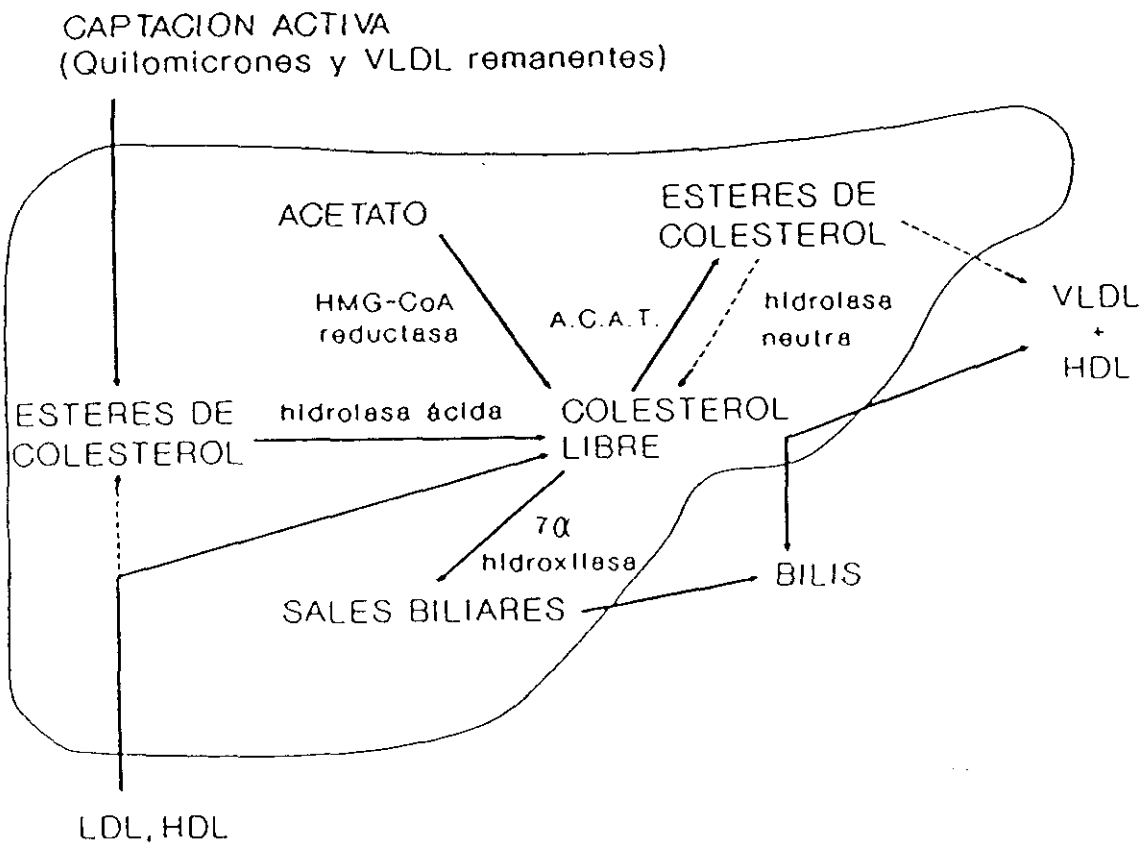
Según Slater y col. (1980) para la producción de ácidos biliares el hígado utiliza principalmente el colesterol sintetizado de "novo" por el mismo y el que le llega vía sanguínea vehiculizado por las LDL.

El paso inicial en la síntesis de las sales biliares es la formación del 7 alfa-hidroxicolesterol a partir de colesterol. Esto es seguido de epimerización del grupo 3 Beta-hidróxilo a la posición 12, si es el ácido cólico el que va a ser sintetizado (Shefer y col., 1970).

La 7 alfa-hidroxilación del colesterol no es solamente el primer paso, sino que es también el paso limitante del proceso.

Existen otras primeras etapas en el proceso, aunque la 7 alfa-hidroxilación parece ser la prioritaria, Elliot y Hyde (1971).

FIGURA N° 5. HOMEOSTASIA DEL COLESTEROL HEPATICO.



El más importante y bien establecido factor de regulación de la 7 alfa-hidroxilación es la circulación enterohepática de la sales biliares. Mosbach (1972) y Myant y Mitropoulos (1977) indican que la eliminación de sales biliares desde el hígado, por fístula del conducto biliar o por alimentación con colestiramina, origina un aumento en la actividad de colesterol 7-alfa-hidroxilasa y consecuentemente un incremento en la síntesis de sales biliares. La restauración del retorno de sales biliares suprime la actividad enzimática y la síntesis de ácidos biliares. El aumento puede ser prevenido con inhibidores de la síntesis de proteínas sugiriendo que este incremento requiere la formación de nueva proteína enzimática.

1.5.2. Componentes grasos hepáticos.

La composición grasa hepática va a ser un fiel reflejo del estado nutritivo y metabólico del individuo.

Como hemos visto más detalladamente en el apartado 1.5.1., el hígado captará principalmente los quilomicrones remanentes procedentes del metabolismo de los quilomicrones formados en el intestino y las LDL procedentes del metabolismo de las VLDL sintetizadas por los hepatocitos.

Además, otras funciones del hígado en el metabolismo de los lípidos son:

- Desdoblamiento de los ácidos grasos para obtener energía. Estos ácidos grasos provienen de la hidrólisis de los triglicéridos del tejido adiposo cuando se activa la lipasa sensible a hormonas en diferentes situaciones metabólicas.

- Síntesis de triglicéridos a partir de carbohidratos y en menor proporción a partir de las proteínas. Esto sólo ocurre cuando la ingesta de estos nutrientes es superior a sus necesidades por parte del organismo. Los triglicéridos así formados son liberados en el tejido adiposo por acción de la lipoproteína-lipasa.

- Síntesis de colesterol y fosfolípidos a partir de los ácidos grasos.

Resumiendo lo anterior podemos concluir que son dos las principales fuentes de la grasa hepática: el tejido adiposo y la grasa dietaria que tras su digestión dará origen a los quilomicrones.

Según Zakim (1982) entre el hígado y el tejido adiposo existe un intercambio continuo de ácidos grasos. El balance entre el almacenaje de triglicéridos en el hígado y en el tejido adiposo se desvía fácilmente hacia la transferencia neta desde el último al primero.

Hay tres hechos que se relacionan con esto. El primero es que la captación hepática de ácidos grasos desde la sangre es función de su concentración. Cuando se incrementa la presencia de ácidos grasos en la sangre el hígado recoge más ácidos grasos.

El segundo es que el hígado puede oxidar o reesterificar estos ácidos grasos, pero probablemente la capacidad de oxidación por el hígado de ácidos grasos es limitada pero no así la capacidad de esterificación.

La tercera razón es la capacidad limitada del hígado para secretar triglicéridos en forma de VLDL. Así, defectos en la síntesis de VLDL pueden conducir a un hígado graso (Farber, 1967), aspecto que ha sido constatado con el uso de agentes que interfieren en la síntesis de proteínas, como la etionina, o en la unión de los componentes de las VLDL, como el ácido orótico (Roheim y col., 1965). En este punto también podrían intervenir los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) n-3, ya que uno de sus posibles efectos, es inhibir la secreción de VLDL.

Por otro lado, la dieta va a influir cuantitativa y cuantitativamente en la composición grasa del hígado.

Cuantitativamente, dietas con alta proporción de colesterol aumentan los niveles de lípidos en el hígado, especialmente de colesterol esterificado.

En cuanto al aspecto cualitativo, la distinta composición en ácidos grasos de la grasa dietaria va a tener su reflejo en una diferente proporción de dichos ácidos grasos en las distintas fracciones lipídicas del hígado (Bernadier, 1988; Hwang y col., 1988).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto comentaremos los trabajos que nos han parecido más relevantes, donde se relaciona composición de la grasa dietaria y los niveles de los diferentes lípidos hepáticos.

Harwood y Geyer (1975) encuentran que los valores lipídicos hepáticos de ratas expresados en mg/g de tejido fresco después de 15 semanas de alimentación con diferentes dietas oscilaba para lípidos totales entre un mínimo de $35,2 \pm 0,7$ con dietas libres de grasa a un máximo de $48,0 \pm 1,6$ con dietas conteniendo sebo de vaca.

Los ésteres de colesterol variaron entre $4,7 \pm 0,5$ en ratas alimentadas con dietas con aceite de maíz y $7,5 \pm 0,6$ para las que recibían en su dieta sebo de vaca. Por último, los fosfolípidos se encontraron entre $25,8 \pm 1,1$ en los animales que no recibieron grasa en su dieta y $38,8 \pm 1,0$ para los que ingirieron sebo de vaca.

Los mismos autores después de 20 semanas encuentran que los valores más bajos para lípidos totales, ésteres de colesterol y fosfolípidos, también en mg/g de tejido fresco, correspondían a los hígados de los animales que no recibieron grasa en su dieta: $37,2 \pm 1,0$, $2,5 \pm 0,2$ y $25,2 \pm 0,7$, respectivamente; mientras que, los valores más elevados se encontraron en los animales alimentados con aceite de maíz en lípidos totales y ésteres de colesterol: $58,1 \pm 2,2$ y $3,9 \pm 0,4$ respectivamente o con aceite de semilla de soja para los fosfolípidos: $31,5 \pm 0,8$.

Bochenek y Rodgers (1978) en ratas Sprague-Dawley alimentadas con dietas conteniendo 24,5% de proteína, 4,2% de grasa (sin colesterol) y 49,7% de carbohidratos obtienen unos valores de lípidos expresados en mg en el total hepático de:

- Lípidos totales: 320 ± 74 .
- Colesterol total: $28 \pm 4,2$.
- Esteres de colesterol: $9,4 \pm 4,6$.
- Fosfolípidos: 246 ± 76 .

De este mismo trabajo referimos a continuación el porcentaje de los ácidos grasos mayoritarios de las distintas fracciones lipídicas hepáticas:

- En fosfolípidos: $34,3 \pm 3,6\%$ (palmítico), $38,7 \pm 3,7\%$ (esteárico), $9,6 \pm 0,7\%$ (oleico) y $9,9 \pm 2,4\%$ (linoléico).

- En ésteres de colesterol: $40,3 \pm 7,8\%$ (palmítico), $26,6 \pm 1,2$ (esteárico), $25,2 \pm 9,6\%$ (oleico) y $2,6 \pm 2,4\%$ (linoléico).

- En triglicéridos: $58,6 \pm 4,0\%$ (palmítico), $8,1 \pm 2,0$ (esteárico), $25,6 \pm 4,3\%$ (oleico) y $1,8 \pm 2,3\%$ (linoléico).

Llama la atención que a pesar de ser la composición de la dieta en ácidos grasos la siguiente: 16,0% (palmítico), 4,2% (esteárico), 24,4% (oleico) y 48,2% (linoléico); en ninguna de las anteriores fracciones lipídicas comentadas el ácido linoléico fuera el más abundante.

Eklund y Sjoblom (1980) en ratas que recibían dietas que diferían en la fuente proteica encuentran unos valores en hígado fresco comprendidos entre $4,8 \pm 0,2\%$ y $6,5 \pm 0,7\%$ de lípidos totales, salvo en el caso de que la fuente proteica de la dieta procediera del plasma, en cuyo caso los valores fueron de $13,9 \pm 1,7\%$.

Quazi y col. (1983) observan en ratas Wistar alimentadas con dietas conteniendo un 20% de caseína, 71,95% de sacarosa y 2,0% de aceite de maíz los siguientes valores: $7,18 \pm 0,29$ mg/g de colesterol, $67,8 \pm 2,6\%$ mg/g de lípidos totales, $19,6 \pm 4,3$ mg/g de fosfolípidos y $40,1 \pm 4,0$ mg/g de triglicéridos.

Imaizumi y col. (1983) alimentando ratas Wistar con dietas que contenían un 20% de caseína y 10% de aceite de semilla de soja señalan en mg/g de hígado los siguientes valores: $7,3 \pm 1,2$ de triglicéridos, $2,97 \pm 0,12$ de colesterol y $39,6 \pm 0,57$ de fosfolípidos.

Sirtori y col. (1984) en ratas Sprague-Dawley alimentadas con dietas estándar de laboratorio encuentran en hígado niveles de colesterol libre de $1,7 \pm 0,1$ mg/g y de ésteres de colesterol de $0,5 \pm 0,1$ mg/g.

Eklund y Sjoblom (1986) en ratas Sprague-Dawley ingiriendo dietas con un 20% de caseína, un 10% de aceite de oliva y sin colesterol obtienen los siguientes niveles en mg/g de hígado seco: $17,8 \pm 0,4$ de lípidos totales, $14,3 \pm 0,6$ de colesterol total y $6,1 \pm 0,2$ de colesterol libre; los cuales fueron ligeramente más bajos que los obtenidos en el caso de dietas con un 20% de proteína de semilla de soja y 10% de aceite de oliva.

Analizando en detalle estos 2 últimos trabajos, vemos que la proporción de ésteres de colesterol respecto al colesterol total es muy diferente. Esto probablemente es debido a que, como indica Beynen (1988), el aceite de oliva promovería la esterificación del colesterol y su acúmulo en el hígado. Esto es otro ejemplo de cómo diferentes tipos de dietas pueden alterar la composición grasas del hígado.

Bernadier (1988) con dietas con un 20% de caseína: lactoalbumina (proporción 1:1), 65% de almidón de maíz y un 5% de aceite de maíz o de coco encontró los siguientes valores en mg/g:

- Lípidos totales: 43 ± 2 (maíz) y 50 ± 3 (coco).
- Colesterol: $2,4 \pm 0,2$ (maíz) y $2,0 \pm 0,1$ (coco).
- Fosfolípidos: 28 ± 1 (maíz) y 31 ± 1 (coco).

En este mismo trabajo al estudiar los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos hepáticos

encontraron los valores que se resúmen en el cuadro adjunto:

ACIDO GRASO	% EN FOSFOLIPIDOS HEPATICOS	
	ACEITE DE MAIZ	ACEITE DE COCO
Palmítico	15,16	15,44
Palmitoleico	0,7	2,26
Esteárico	20,78	22,01
Oleico	7,17	12,02
Linoléico	14,38	7,98
Linolénico	0,41	0,35
Araquidónico	29,36	18,01
Eicosapentaenoico	2,14	2,24
Docosaheptaenoico	3,53	6,64

Hwang y col. (1988) encuentran como la diferente composición en ácidos grasos de la dieta se refleja en una diferente composición de dichos ácidos grasos en los lípidos hepáticos. En este caso, al estudiar la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos hepáticos entre 6 grupos de ratas Sprague-Dawley, 3 de los cuales ingerían cantidades crecientes de ácido linolénico y los otros 3 cantidades crecientes de concentrado de aceite de pescado, se pueden observar las siguientes diferencias:

- Menor proporción de ácidos linolénico y araquidónico en el grupo alimentado con dietas que contienen el concentrado de aceite de pescado.

- Mayor proporción de ácido docosaheptaenoico en las ratas que ingieren el concentrado de aceite de pescado.

Estos datos difieren marcadamente de los obtenidos en ratas controles que consumían dietas con 8% de aceite de coco hidrogenado y 2% de aceite de cártamo, donde los principales ácidos grasos en orden de mayor a menor concentración fueron: araquidónico, esteárico, oleico y linoléico.

Lakshman y col. (1988) obtienen en ratas Wistar-Furth alimentadas con dietas con un 40% en grasa (mezcla de aceite de hígado de bacalao, aceite de maíz y aceite de oliva), 36% de dextromaltosa, 20% de proteína y el resto carbohidratos unos valores hepáticos de colesterol de 158 ± 41 mg/100g de tejido y de 211 ± 102 mg/100 g de tejido.

1.5.3. Influencia de los diferentes tipos de ácidos grasos sobre el metabolismo lipídico.

1.5.3.1. Ácidos grasos saturados

Ya en 1957 Keys y col. indicaron la relación positiva entre la sustitución de hidratos de carbono por ácidos grasos saturados y el incremento de la colesterolemia. Estos mismos autores señalan que no todos los ácidos grasos saturados tienen el mismo efecto hipercolesterolemizante, asignando al ácido esteárico un papel neutral.

Bonanome y Grundy (1988) comparando el efecto de los ácidos esteárico, oleico y palmítico concluyeron que los dos primeros originaban igual descenso de los niveles séricos de colesterol al compararlos con el palmítico. Una posible explicación al diferente efecto de los ácidos palmítico y esteárico podría ser que este último ácido graso saturado es pobremente absorbido debido a su mayor insolubilidad. Sin embargo, Bonanome y Grundy (1988) en un estudio en humanos señalaron que una dieta rica en esteárico es bien absorbida. Según Grundy y Denke (1990) el efecto diferencial entre estos dos ácidos grasos saturados, se debería a que el ácido esteárico, al ser la desaturación un proceso muy rápido, es velozmente transformado en el organismo en ácido oleico, mientras que el ácido palmítico se podría acumular en los tejidos debido a que el proceso de elongación es un proceso lento.

En otros trabajos se indica que con la ingesta de grasas saturadas, con o sin la adición de colesterol, se induce una marcada hipercolesterolemia, asociada a elevados niveles de apo E en suero y la presencia de lipoproteínas anormales: Beta-VLDL y HDL en ratas (Swift y col., 1980), monos (Nicolasi y Hayes, 1980), perros (Mahley y col., 1974), conejos (Ross y Zilverstmit, 1977) y cerdos (Chapman y Mills, 1977). En cambio, Durand y col. (1985) no encuentran correlación entre la colesterolemia y los ácidos grasos saturados de la dieta o del suero en ratas.

Mattson y Grundy (1985), Grundy y Vega (1988), Bonanome y Grundy (1988), Grundy y Denke (1990) indicaron que el incremento de las concentraciones séricas causadas por la ingesta de ácidos grasos saturados se debía al aumento de las LDL.

Las causas de este supuesto efecto hipercolesterolemizante de la grasa saturada no están aún muy claras. Así, Green y Green (1983) indican que la absorción de colesterol no está influenciada por la grasa saturada dietaria, por lo que este efecto hipercolesterolemizante se debería a otras causas, entre las que cabría destacar su influencia sobre el metabolismo lipoproteico. Estos mismos autores, indican que el metabolismo extrahepático de lipoproteínas difiere en las ratas alimentadas con dietas que contienen ácidos grasos de variada saturación.

La sustitución extrema de ácidos grasos saturados por ácidos grasos poliinsaturados puede disminuir los niveles de HDL en suero (Mattson y Grundy, 1985). De igual forma el reemplazamiento isocalórico de ácidos grasos saturados por carbohidratos disminuye los niveles de HDL-colesterol, efecto que no tiene lugar si se utilizan ácidos grasos monoinsaturados (Grundy, 1986). Con respecto a las LDL, sustituciones dietarias equivalentes de la grasa saturada provocarían un descenso de sus niveles (Mensink y Katan, 1987).

El mecanismo que relaciona el incremento de las LDL con la ingesta de grasa saturada parece estar relacionado con una disminución de la síntesis de receptores hepáticos para apoB-100 de las LDL (Brown y Goldstein, 1984; Shepherd y col. 1980; Nicolasi y col., 1990). Para estos autores la ingesta de estos ácidos grasos disminuiría la actividad del receptor de LDL.

Spady y Dietschy (1989) indicaron que la ingesta de estos ácidos grasos saturados reduce la eliminación de las LDL via receptor.

Localzo y col. (1987) sugirieron que el enriquecimiento con ácidos grasos saturados de los fosfolípidos de membrana interfieren la función normal del receptor de LDL, probablemente reduciendo la unión o internalización de las LDL circulantes. Green y col. (1984) observan en ratas que los quilomicrones ricos en ácidos grasos saturados tienden a ser metabolizados más lentamente que los quilomicrones ricos en ácidos grasos poliinsaturados.

Estos mismos autores (Green y col., 1984) en ratas alimentadas con grasa saturada y colesterol respecto a otras que recibían ácidos grasos poliinsaturados y colesterol señalan un incremento de la trigliceridemia, consecuencia de una elevación de la producción hepática de VLDL ricas en triglicéridos. Estos autores sugieren que dicho incremento puede relacionarse con el menor aclaramiento de quilomicrones

ricos en ácidos grasos saturados y colesterol.

Esta hipótesis estaría de acuerdo con la observación de Floren y Nilsson (1977) de que la alimentación con dietas ricas en ácidos grasos saturados y colesterol puede estar asociada a un incremento en la secreción de VLDL ricas en triglicéridos y colesterol por el hígado. Así, Spady y Dietschy (1989) observaron un incremento en la producción de LDL, aunque Sorci-Thomas y col. (1989) señalaron que una dieta rica en ácidos grasos saturados no incrementa la cantidad hepática de RNAm para Apo B en monos.

El incremento de triglicéridos plasmáticos observados en ratas después de la alimentación con grasa saturada y colesterol podría ser explicada según Parks y Rudel (1982) por una disminución de la lipoprotein-lipasa o/y por estar afectado el reconocimiento y aclaramiento de los quilomicrones y VLDL remanentes (Floren y Nilsson, 1977).

1.5.3.2. Ácidos grasos monoinsaturados.

Desde los trabajos de Keys y col. (1957) las grasas monoenoicas han sido consideradas como neutras respecto a sus efectos colesterolemiantes. La sustitución de forma isocalórica de carbohidratos por ácidos grasos monoinsaturados no tiene efecto sobre el colesterol sérico.

Sin embargo, muchos autores han olvidado que, obviamente, la sustitución en la dieta de grasas saturadas por monoinsaturadas causa un decremento en la colesterolemia y han utilizado el aceite de oliva (prototipo de grasa monoinsaturada) como dieta basal. Naturalmente si a una persona que consume una dieta diaria de 2700 Kcal sustituimos 3 gramos de grasa saturada por 3 gramos de aceite de oliva se conseguirá un descenso aproximado en los niveles de colesterol de 2,7 mg/dl, por término medio, y si la sustitución es en vez de 3 gramos de 30 gramos el descenso esperado en la colesterolemia sería de 27 mg/dl (Grande, 1989).

Más recientemente los efectos de las grasas de diferente composición en ácidos grasos sobre los niveles de HDL-colesterol y LDL-colesterol han sido estudiados por varios investigadores (Grundy, 1987; Nestel, 1987; Grundy y Denke, 1990).

Varios autores han demostrado que las grasas monoinsaturadas, como el aceite de oliva, originan unos

niveles de colesterol total sérico similares a los producidos por las grasas poliinsaturadas (Grundy, 1987; Oya y col., 1989; Mensink y col., 1989). Estos mismos estudios han indicado que tales grasas monoinsaturadas no disminuyen los niveles de HDL-colesterol sino que incluso las puede aumentar.

El hallazgo más interesante del trabajo de Oya y col. (1989) es el aumento de los valores de HDL-colesterol tanto a los dos como a los siete meses en los individuos que ingieren las dietas con aceite de oliva, disminuyendo el cociente colesterol total/HDL-colesterol. Los niveles de apo B y A-I se modificaron de forma paralela a los cambios de LDL y HDL-colesterol respectivamente.

Esta es la razón que explica, según el profesor Grande (1989), el actual interés por el papel que juegan las grasas monoinsaturadas en general, y el aceite de oliva en particular, en la prevención de las enfermedades cardiovasculares.

Según Grundy (1987) el mayor efecto de los ácidos grasos monoinsaturados cuando sustituyen a los ácidos grasos saturados en la dieta es la disminución de los niveles de LDL-colesterol. Esta respuesta puede ocurrir por uno o más de los tres mecanismos siguientes:

- a) Decreciendo la salida de VLDL, el precursor de las LDL.
- b) Reduciendo el contenido de colesterol de las LDL.
- c) Incrementando la actividad de los receptores para las LDL.

Esta última posibilidad parece ser la más probable, evitando la supresión de la actividad de los receptores para las LDL, por el consumo de grasas saturadas. El mecanismo debe ser pasivo, es decir no se estimularía la síntesis de los receptores, sino que aumentaría la actividad. Beynen (1988), a este respecto, indica que la disminución observada en ratas que consumen dietas con aceite de oliva en los niveles de colesterol libre hepático favorece la actividad de los receptores de LDL del hígado, al ser esta la forma metabólicamente activa que inhibe el funcionamiento de dichos receptores. Hay que indicar que en experimentos a más largo plazo, tal y como indican Kritchevsky y col. citados en el trabajo de Beynen (1988), aparece un aumento de la concentración de colesterol libre hepático, debido probablemente a una capacidad limitada del hígado a almacenar ésteres de colesterol.

Beynen (1988) observa que dietas ricas en aceite de oliva provocan en ratas y conejos un incremento de la concentración de colesterol total hepático, aunque, como hemos visto disminuya el colesterol libre, lo que parece indicar que el aceite de oliva promueve la esterificación del colesterol hepático.

Con respecto a los lípidos plasmáticos, Cuesta y col., (1987a) estudiando en ratas los efectos de dietas conteniendo aceite de oliva o una grasa sólida de características similares al aceite de palma sobre la lipemia y lipoproteinemia no encuentran variaciones significativas en el colesterol ni en los triglicéridos, pero si en la fosfolipemia y en el contenido en fosfolípidos en todas las lipoproteínas que fueron más bajos en el lote alimentado con la grasa sólida. El cociente colesterol total/fosfolípidos de este último lote señaló un mayor riesgo de aterogénesis.

En lo referente a los triglicéridos, Bonanome y Grundy (1988), Grundy y col. (1988), Garg y col. (1988) y Grundy y Denke, (1990) señalaron que dietas ricas en ácido oleico disminuían la concentración de triglicéridos al compararlas con dietas ricas en ácidos grasos saturados, por lo tanto, estas dietas podrían ser utilizadas en el control de la hipertrigliceridemia.

Uno de los campos de investigación más prometedores ha surgido la hipótesis que el ácido oleico ejerce un papel sinérgico sobre el ácido eicosapentaenoico incrementando la captación de tal ácido graso por las células corporales y, por tanto, incrementando posiblemente sus efectos fisiológicos (Sanders, 1991).

1.5.3.3. Ácidos grasos poliinsaturados

Keys y col. (1957) señalan a los ácidos grasos poliinsaturados como hipocolesterolemiantes. A esta misma conclusión llegan numerosos autores (Vega y col., 1982; Vessby y col., 1982; Ehnholm y col., 1984).

La reducción del colesterol producida por la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados ocurre a nivel de todas las lipoproteínas, descendiendo sobre todo los niveles de LDL-colesterol, pero también de VLDL-colesterol y HDL-colesterol (Shepherd y col., 1978).

Esta disminución de HDL-colesterol ha sido descrita también por otros autores (Vessby y col., 1980). Esto originaría que la relación LDL-colesterol/HDL-colesterol no variará, por lo que el supuesto efecto beneficio-

so desde el punto de vista de las enfermedades cardiovasculares probablemente es de menor cuantía. Hay que tener en cuenta que estos estudios se realizaron en periodos - cortos de tiempo y con una ingesta excesiva y poco realista de ácidos grasos poliinsaturados. En estudios más largos e ingestas menos marcadas de estos ácidos grasos (Schwandt y col., 1982) obtienen un balance favorable - entre LDL-colesterol y HDL-colesterol.

Por otro lado, Lock y col. (1983) sugieren que los bajos niveles de LDL-colesterol obtenidos con la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados son protectores frente a la aterosclerosis a pesar de la disminución de las HDL-colesterol.

Todos estos efectos de los ácidos grasos poliinsaturados discutidos hasta ahora sobre la colesterolemia y demás parámetros lipídicos, se han referido a la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados en general, si bien, hay que señalar que dependiendo de la familia de ácido graso que se trate, n-6 ó n-3, incluso, para distintos ácidos grasos dentro de la misma familia, los efectos van a ser muchas veces diferentes.

Uno de los ácidos grasos poliinsaturados más estudiados es el ácido linoléico (C 18:2 n-6) presente en muchos aceites vegetales como el de cártamo, el de maíz, el de soja o el de girasol.

El efecto de la ingesta de estos ácidos grasos sobre los niveles de lípidos hepáticos y de lipoproteínas plasmáticas ha sido estudiado por numerosos autores, no habiéndose obtenido siempre resultados equivalentes.

Así, Hostmark y col. (1982) encuentran en ratas alimentadas con dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados n-6 disminución del colesterol plasmático, pero Rifkind (1983) observa un aumento del mismo, mientras que, Hostmark y col. (1980) no encuentran ningún efecto.

Con respecto a la concentración HDL-colesterol, Hostmark y col. (1980) observan una disminución con dietas con un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados n-6.

Kris-Etherton y col. (1984) señalan que ratas alimentadas con dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados n-6 tienen concentraciones más bajas de triglicéridos y presentan una mayor producción de HDL-colesterol hepático, pero similares de HDL-colesterol plasmático que ratas que recibían en su dieta aceite de oliva o de palma. Como el aclaramiento de lipoproteínas ricas en triglicéridos es proporcional a la concentración

de HDL en plasma (Kekki, 1980), y esta concentración proporcional a la de apo C-II y C-III (Kashyap y col., 1983), un aumento en la producción de HDL hepáticas puede explicar en parte el efecto hipotrigliceridemiante de los ácidos grasos poliinsaturados quizás debido a un aumento de la síntesis y secreción de apoproteínas C.

Por otro lado, la presencia de ácidos grasos poliinsaturados n-6 en las lipoproteínas puede influir en su metabolismo acelerando su captación. Así Gavigan y Knight (1981) observan que a mayor cantidad de linoleato en las LDL, mayor es su captación por los fibroblastos al compararlas con las LDL conteniendo ácidos grasos más saturados.

Bochenek y Rodgers (1978) después de analizar varias posibilidades indican que el efecto hipocolesterolémico de las grasas insaturadas n-6 se debe a la redistribución del colesterol plasmático en los tejidos tisulares.

Según Vega y col. (1982) la sustitución de ácidos grasos saturados de la dieta por ácido linoleico conduce a una disminución paralela de LDL-colesterol y del número de partículas de LDL, por lo que la hipótesis de Spritz y Mishkel (1969) en la que los ácidos grasos poliinsaturados excluyen estéricamente al colesterol de la partícula de LDL no parece la más adecuada.

Estudios cinéticos de apo B-LDL han señalado un efecto claro de los ácidos grasos poliinsaturados sobre el metabolismo de las LDL, particularmente a nivel de receptor para apo-B, lo cual conduce a una disminución sustancial de la concentración de LDL plasmática (Spady y Dietschy, 1985).

Otro de los ácidos grasos poliinsaturados importante por su posible papel en la prevención de las enfermedades cardiovasculares es el ácido docosahexaenoico (DHA, C 22:6 n-3) y el ácido eicosapentaenoico (EPA, C 20:5 n-3), muy abundantes en los aceites de pescado.

Su consumo es beneficioso desde el punto de vista de la enfermedad cardiovascular por dos razones:

- Disminuyen la agregación plaquetaria, al interferir en el metabolismo de prostaciclinas, tromboxanos y leucotrienos (Lands, 1986; Sánchez-Muniz, 1987; Nestel, 1990; Kinsella y col. 1990a; Simopoulos y col., 1991).

- Disminuyen los lípidos plasmáticos tanto en personas sanas como en hiperlipémicas y en diferentes animales de experimentación, como se indica en los trabajos de Huang y col., (1986), Sánchez-Muniz (1987), Nestel (1990); Kinsella y col. (1990b); Simopoulos y col. (1991).

Son numerosos los trabajos donde se aprecia que los ácidos grasos poliinsaturados n-3 producen mayor reducción de lípidos en plasma que los ácidos grasos poliinsaturados n-6.

Así, Wong y col. (1984) encontraron en ratas alimentadas con un 15% (en peso) de Max-EPA durante 2 semanas tuvieron un 40% más bajo los niveles plasmáticos de triglicéridos que las alimentadas con igual cantidad de aceite de cártamo (rico en ácido linoléico).

Huang y col. (1986) compararon el efecto de dietas conteniendo diferentes tipos de aceite (cártamo o pescado) sobre los lípidos plasmáticos de ratas macho Sprague-Dawley. Observan que, en general, los lípidos plasmáticos son más bajos en ratas alimentadas con aceite de pescado en comparación con las que recibían aceite de cártamo.

También en el trabajo de Wong y col. (1984) se indica en ratas alimentadas con suplementos de aceite de pescado, frente a las alimentadas con aceite de cártamo, una disminución de la lipólisis, aumento de la cetogénesis, aumento de la oxidación de ácidos grasos y disminución de la secreción de triglicéridos (VLDL-triglicéridos).

Illingworth y col. (1984) encuentran niveles un 20% más bajos de LDL-colesterol usando dietas con Max-EPA (2% de PUFA n-6, 30% de ácidos grasos saturados y 35% de PUFA n-3) frente a dietas con 37% de ácidos grasos saturados y 18% de PUFA n-6.

A pesar de todo, existen otros trabajos donde este efecto diferencial entre PUFA n-3 y n-6 no es tan claro (Harris y col., 1983; Nestel y col., 1984).

Sin embargo, las principales diferencias entre estas dos familias de ácidos grasos se centra en la síntesis de leucotrienos, prostaciclina y tromboxanos, aspecto al cual, debido al contenido de esta memoria, no nos referiremos.

1.6. INCIDENCIA DE LA INGESTA DE GRASAS ALTERADAS POR FRITURA SOBRE DIFERENTES PARAMETROS DE EVALUACION NUTRICIONAL Y TOXICOLOGICA, LIPEMIA Y LIPOPROTEINEMIA DE RATAS.

1.6.1.Efectos sobre parámetros de evaluación Nutricional y toxicológica.

1.6.1.1. Ingesta y Peso.

Uno de los procesos culinarios más populares es el de la fritura en baño de aceite, cuyas principales ventajas residen en el incremento de la palatabilidad del alimento así tratado, junto con el acortamiento del tiempo de preparación del mismo.

Pero hay que tener en cuenta que un proceso de calentamiento excesivo de la grasa durante la fritura destruye los aspectos sensoriales (sabor, sensación en la boca, olor y apariencia), responsables de la aceptación de los alimentos fritos, por lo que el consumo de alimentos preparados con grasas sobreutilizadas está autolimitado (Clark y Serbia., 1991).

Además Naim y col. (1977) relacionan los factores organolépticos del alimento que puede condicionar la ingesta del mismo, con otros factores post-ingesta que pueden influir en la cantidad de dieta consumida por los animales de experimentación (ratas) e incluso en la elección de la misma.

Existe una fuerte controversia en los resultados y mecanismos por los cuales las grasas de fritura podrían ejercer su efecto sobre el peso e ingesta. Este efecto depende de las condiciones en que se efectúa la fritura, de la naturaleza de la grasa empleada, del tiempo que haya sido utilizada dicha grasa y de la naturaleza del alimento a freír, como ya se ha descrito en el apartado 1.2.

Existen numerosos trabajos e investigaciones sobre el efecto de las grasas procedentes de fritura sobre el peso e ingesta y sus posibles repercusiones toxicológicas.

No se puede olvidar que las alteraciones que tienen lugar pueden depender en gran parte del alimento que se somete a fritura y por lo tanto, las extrapolaciones deducidas de los resultados obtenidos del calentamiento de los aceites en ausencia de alimentos

aceite de girasol o manteca de cerdo, respondían de igual manera, tanto crudos como fritos. Además dichos autores especificaban que estas dos últimas grasas se comportaban peor, tanto crudas como fritas, que el aceite de oliva antes ó después de su utilización en frituras.

Así mismo, Nolen (1973) investigó en perros alimentados con aceite de soja usado en frituras y vió que la ingesta del aceite fresco (sin usar) produjo más rápida ganancia de peso que la ingesta del aceite usado, éste último indujo a su vez, una menor tasa de crecimiento y fue absorbido en mayor proporción.

También se ha visto que una reducción en el contenido de proteína de la dieta contribuye al efecto negativo que tiene la ingesta de aceite frito sobre el crecimiento. Así Rafalski y col. (1978) señalan que el ácido linoléico peroxidado se une selectivamente a los aminoácidos azufrados de las proteínas disminuyendo así, la utilización digestiva de las mismas.

Roubal y Tappel (1966) y Horigome y Minra (1974) citados por Nielsen y col. (1985) señalan que casi todos los aminoácidos reaccionan con los distintos productos de oxidación de lípidos primarios y secundarios.

Parece ser que el efecto nocivo de las grasas usadas en fritura es debido al componente polar de las mismas. Billek (1980) trabajando en asociación con la sociedad alemana de investigación en grasas, analizó 400 grasas usadas en fritura, llegando a la conclusión de que un nivel superior al 30% de componentes polares era inaceptable.

Este mismo autor indica que en condiciones domésticas las grasas calentadas sólo tienen aproximadamente entre un 10 y un 20% de compuestos polares, indicando que no causan ningún efecto perjudicial para la salud cuando se administran a animales de laboratorio.

Estas mismas conclusiones fueron obtenidas por Morton (1977) y Varela (1980).

Izaki y col. (1984) estudiaron la incidencia que tenía el aceite de cambrá utilizado en frituras repetidas, (231 frituras en 66 días durante un periodo de 3,5 horas cada día) sobre animales de experimentación, no observando ninguna diferencia en la ingesta y crecimiento de estos animales con respecto a los animales controles que ingerían un aceite de cambrá crudo.

Sin embargo, según los estudios realizados en nuestro Departamento por Rodríguez y col. (1984),

utilizando aceite de oliva y grasa vegetal más saturada en 30 frituras sucesivas de patatas a una T° de 180°C, existe una tendencia a la disminución de peso en las ratas que ingieren el alimento frito con respecto a las que lo ingieren crudo. Estos resultados podrían ser debidos a la existencia de un efecto depresor que causaría un menor incremento en el peso de los animales a los que se les administraban aceites fritos, probablemente debido a interferencias entre la grasa y otros nutrientes (por ejemplo proteínas) de la dieta que impedirían la utilización correcta de ellos.

Por otro lado, De Goethard (1985) en sus estudios de alimentación en ratas con aceites muy utilizados, los cuales contenían gran cantidad de triglicéridos dímeros y polímeros, comprobó que no existían diferencias significativas entre los efectos de ingerir aceite de girasol y los de un aceite de soja parcial o totalmente hidrogenado (HSBO), concluyendo, por tanto, que los aceites con ácidos grasos poliinsaturados pueden usarse para freír, tanto como los monoinsaturados.

Billek (1985) por otra parte, describen los resultados obtenidos al administrar a ratas aceite de girasol que había sido usado para freír "fish fingers" (palitos de pescado) en la industria alimentaria, el cual tenía un 20% de compuestos polares, observando un descenso de peso significativo en dichas ratas respecto al observado en aquellas ratas que ingerían el mismo aceite sin usar.

Giani y col. (1985), indican que el efecto depresor producido por la ingesta de una mezcla de ácidos grasos calentados en el crecimiento podría ser paliado con un suplemento alto de vitamina E.

Sánchez-Muniz y col. (1991a) estudiando la aceptabilidad de dietas conteniendo sardinas fritas en aceite de oliva durante 4 semanas en ratas Wistar en crecimiento, encontraron una respuesta equivalente de los animales para sardinas procedentes de la primera y segunda fritura en aceite de oliva que para componentes basales estándares (caseína y aceite de oliva). Sin embargo la aceptabilidad de dietas conteniendo sardinas procedentes de la 8ª, 9 y 10ª fritura fue un 36% menor que para las sardinas de la primera y segunda fritura. Esta disminución de la ingesta cursó con niveles de ganancia de peso del orden de un 50% menos, así como con un índice de eficacia dietaria (ganancia de peso/ingesta dietaria) significativamente menor.

1.6.1.2. Utilización digestiva y metabólica.

La revisión de Deuel (1955) sobre digestibilidad de la grasa es pionera y clásica, aquí sólo describimos brevemente algunos de los puntos más importantes de los que trata en su trabajo y que están relacionados con nuestro estudio. Según este autor, para mucha gente los términos de digestibilidad y absorción son sinónimos y connotan el mismo fenómeno fisiológico. Sin embargo, para el bioquímico y para el fisiólogo, absorción y digestibilidad constituyen dos aspectos diferentes del proceso, aunque a menudo se relacionen.

La absorción es el proceso donde las sustancias alimenticias pasan desde el intestino delgado al medio interno, mientras que el coeficiente de digestibilidad cuantifica el porcentaje de material ingerido que es absorbido y no aparece en heces.

Deuel (1955) señala que hay una relación inversa entre el punto de fusión de una grasa y su digestibilidad siempre que el punto de fusión no sobrepase los 50°C.

Esta relación inversa es evidente en la absorción de triglicéridos sencillos en ratas, en las cuales a priori podría afectar a la digestibilidad de grasas fritas cuyo índice de saturación se incrementa en relación a las mismas grasas frescas a causa de la disminución en la fracción de ácidos grasos poliinsaturados.

Hay sin embargo, otros investigadores como Hoagand y Snider (1955) (citados por Deuel, 1955) que han señalado que sus investigaciones no apoyan la tesis de que exista una relación inversa entre el punto de fusión y la digestibilidad.

En el caso de la grasa es especialmente interesante el problema de la adaptación digestiva de este nutriente, ya que es el que presenta una digestión más compleja y una capacidad digestiva limitada. Esta limitación es importante, porque un exceso de ingesta grasa, da origen a que ésta no se absorba, produciendo fenómenos de aceleración del tiempo de paso digestivo, lo que trae como consecuencia la disminución de los coeficientes de digestibilidad, no sólo de la grasa, sino también del resto de los nutrientes.

Un constituyente dietético que podría modificar el coeficiente de digestibilidad de la grasa es la proteína. Mientras que algunos autores dicen que las grasas son digeridas en menor cantidad en una dieta baja en proteína (14%) que en una alta (30%), (Primrose y

Burr, 1955 citados por Deuel), otros fueron incapaces de encontrar disminución de la digestibilidad en perros o en personas que ingerían una dieta de bajo nivel proteico (Jaerros y Chittendon, 1955). Coffey, 1955 (citado por Deuel, 1955) dice que los niveles proteicos tienen poca importancia en la digestibilidad de la grasa.

El volumen de la ingesta grasa puede llegar a modificar el coeficiente de digestibilidad de la misma con mayor sensibilidad que el tipo de grasa empleada, ya que los procesos fisiológicos de digestión y absorción pueden teóricamente, adaptarse a la composición cuali y cuantitativa de la dieta.

Varela y Murillo (1975) realizaron ensayos en ratas, en los que lotes de animales consumían una dieta con niveles del 10,20,30 y hasta 40% de aceite de oliva. Encontraron que el 20% es el nivel óptimo al que corresponde una mayor ingesta y que este nivel desciende con mayores concentraciones. Estos autores relacionan el nivel óptimo de la grasa en cuanto a la acción palatable, con la capacidad digestiva del animal.

Respecto al efecto que el tipo de grasa dietética pueda ejercer sobre la eficacia digestiva, no existe una unanimidad de criterios, aunque en líneas generales, como ya hemos dicho, toda grasa cuyo punto de fusión esté por debajo de la temperatura corporal presenta coeficientes de digestibilidad muy satisfactorios.

Varela y col. (1967) indicaron que la digestibilidad de la grasa no se modifica, independientemente del tipo de grasa que se emplee (animal o vegetal).

Deuel (1955) no consideró que la polimerización de grasas fritas es uno de los principales factores que afectan a la disminución de la digestibilidad. Aunque los efectos que la polimerización tiene en la digestibilidad de grasas de origen animal y de origen vegetal es similar, hay que destacar que la formación de polímeros está limitada a las grasas que han sido calentadas por encima de temperaturas consideradas como normales para un proceso de fritura.

En una revisión cronológica de estos estudios se encontró que Crampton y col. (1956) señalan - que la principal razón del bajo nivel nutritivo de las dietas que contienen aceite de linaza que ha sido calentado a 275°C era la presencia en estas grasas polimerizadas de uno o más radicales de ácidos grasos dímeros que influían en el bajo peso de las ratas. Debemos reseñar que calentamiento a 275°C es sobrecalentamiento y no fritura bajo condiciones normales.

Laseu y col. citados por Custot (1959) indican que la digestibilidad disminuye en ratas siempre que fuera usado aceite de oliva, de maiz y de algodón, calentado a 180°C durante 24 horas o bien aceite de sardina calentado a 250°C durante poco tiempo.

Alexander (1966) alimentó a ratas durante 4 semanas con dietas que contenían 15% de aceite de algodón o bien aceite de soja hidrogenado o no hidrogenado que habían sido usados en frituras a 180°C durante 24 horas. Observando que el coeficiente de utilización digestiva de lípidos descendió significativamente de un 88% a un 93% respecto a los controles.

Posteriormente, Potteau y col. (1977,1978) encontraron que los aceites llegaban a estar más polimerizados al ser utilizados en frituras y que la utilización digestiva de estos aceites polimerizados disminuía, aunque una parte de estos polímeros fuera eliminada por heces. Seguimos insistiendo que esta polimerización sucede en grasas sobrecalentadas y que no se produce en grandes cantidades bajo condiciones normales de fritura.

Combe y col. (1981) observaron que cuando la grasa es expuesta a altas temperaturas, especialmente cuando la grasa es rica en ácidos grasos poliinsaturados, puede sufrir cambios químicos, éstos incluyen productos de polimerización, los cuales pueden causar efectos fisiológicos adversos, tales como depresión del apetito, de crecimiento, mala absorción intestinal, un metabolismo basal más bajo, bajada de la temperatura corporal y una mortalidad mayor. Estos efectos biológicos parecen estar relacionados con compuestos poliméricos, de tipo termoxidativo.

Cuesta y col. (1988) encontraron que disminuía la digestibilidad de grasas calentadas en todos los casos que habían estudiado. Aunque estudios dirigidos con anterioridad por Lanteaume y col. (1966;1968) y por Le Floch y col. (1968) sobre fritura con aceite de granilla de uva rica en ácido linoleico, indican que no se ve afectada la digestibilidad con dicho aceite.

Los experimentos dirigidos por Varela y Sánchez-Muniz (1986) sobre diferentes tipos de grasa cocinadas pueden corroborar los trabajos de los autores anteriormente citados, ya que usaron aceite de oliva, de soja y grasa sólida anhidra para freir 10 veces a nivel industrial: patatas, sardinas y carne de vaca. Cada grasa de estos tipos de fritura sirvió para realizar dietas semisintéticas que contenían un 15% de materia grasa. También se estudió un aceite de oliva empleado en una

cocina institucional en el cual se freía variedad de alimentos. Las grasas fueron administradas en lotes de 10 ratas durante 10 días. Los resultados muestran que el coeficiente de digestibilidad del aceite de oliva desde la primera fritura era superior que el de las otras grasas y solamente se modificó durante la décima fritura, mientras que con las otras grasas dicho coeficiente disminuía desde la primera fritura.

En la primera fritura de carne con aceite de oliva y con grasa sólida el comportamiento fue similar respecto a sus coeficientes de digestibilidad que descendieron más tarde para estabilizarse en la décima fritura.

Por otra parte, el coeficiente de digestibilidad del aceite de soja cayó sustancialmente en la primera fritura y continuó haciendo lo mismo en la décima. En la primera fritura de sardinas, no hubo variación en el coeficiente de digestibilidad de aceite de oliva pero con soja y con grasa sólida sí disminuyó. En la décima fritura, el coeficiente del aceite de oliva cayó hasta el mismo nivel que habían descendido el de soja y la grasa sólida en la primera fritura.

La conclusión general que sacamos de este experimento es que el aceite de oliva tiene un comportamiento mejor que las otras grasas friendo los mismos alimentos, y el mismo número de veces.

En tanto en cuanto el alimento sea frito bajo condiciones caseras de fritura, no existen cambios drásticos en el coeficiente de digestibilidad de las grasas, con lo que no se ve modificado su valor nutritivo.

Recientemente, Márquez-Ruiz y col. (1990a) establecen que la digestibilidad disminuye con el incremento de la alteración de la grasa, así observan que las grasas sometidas a condiciones termoxidativas drásticas pueden ser tóxicas para los animales de experimentación, sobre todo si se trata de grasas ricas en ácidos grasos poliinsaturados y más específicamente en ácido linolénico, sobre todo si se trabaja a temperaturas muy elevadas y en presencia de oxígeno y si los animales sometidos a la experiencia son muy jóvenes o bien están sometidos a dietas deficientes de nutrientes.

Por último señalaremos que la adición de aceite fresco para la reposición del aceite perdido en la fritura puede ser beneficioso, ya que se alarga la vida útil del aceite y da lugar a un producto frito de mayor calidad, no observándose ninguna alteración en la digestibilidad y absorción de dicho producto (Robertson,

1967; Clark y Serbia, 1991).

1.6.1.3. Toxicidad de las grasas calentadas ó utilizadas en frituras.

En el capítulo 1.4.3. se expuso con amplitud, que en el calentamiento que sufren las grasas durante el proceso de fritura se produce una degradación térmica oxidativa e hidrolítica en las mismas, que da origen a la formación de una gran cantidad de especies químicas nuevas, tales como ácidos grasos oxidados, dímeros, monómeros, polímeros, etc.

Los especialistas en nutrición y toxicología se esfuerzan en saber si la ingesta de tales compuestos puede tener consecuencias perjudiciales para el organismo.

Los numerosos estudios efectuados en este campo han demostrado que las ratas sometidas a regímenes ricos en componentes grasos térmicamente modificados tienen disminuídas las tasas de crecimiento, sufren hepatomegalía, diarreas, alopecias, etc., (Artman, 1969; Causeret y col., 1982). Además existe una gran evidencia, de que las grasas calentadas y oxidadas tienen potencialmente efectos cancerígenos (Roffo, 1944).

Peacock y Beck (1951) y posteriormente Gómez Elvira (1987) vieron que sometiendo un aceite de girasol a oxidación y calentamiento prolongado, al administrárselo a ratas se producía en éstas un incremento de la incidencia de cancer de estómago respecto a ratas controles.

Sin embargo, Kaunizt (1967); Clark (1976) y Stier (1989) señalan que los aceites y grasas calentadas moderadamente no constituyen una amenaza para la salud pública. No obstante, el uso durante largo tiempo de los aceites y las grasas utilizadas en frituras repetidas puede producir en las mismas compuestos tóxicos, aunque el nivel de dichos compuestos sea tan bajo, que no resulte significativo (Nolen, 1972).

Morton (1977) en investigaciones llevadas a cabo en condiciones normales, domésticas o comerciales, con o sin la presencia de alimentos, ha deducido que las grasas de fritura contienen de un 10 a un 20% de compuestos polimerizados, y que cuando grasas de este tipo se dan a animales de experimentación, aún en muy altas cantidades, no se producen efectos nocivos. Igualmente Alim y Morton (1974) han encontrado que cuando se calienta en

condiciones de laboratorio aceite de oliva, aparece muy poca alteración, o lo que es lo mismo, el aceite permanece bastante estable.

En una espléndida revisión titulada "Evaluación de la calidad de las grasas de fritura. Aspectos Nutricionales". Potteau (1978) nos describe una serie de estudios de distintos autores sobre los diferentes productos formados en el calentamiento de las grasas y de sus posibles efectos fisiológicos y toxicológicos.

Crampton y col. (1953) separaron del aceite de linaza, calentado a 275°C durante 12 horas en atmósfera inerte, distintas fracciones que contenían monómeros lineales, cíclicos y polímeros. Los monómeros lineales fueron administrados a ratas en distinta proporción (10% ó 20%) y fueron perfectamente tolerados, mientras que los monómeros cíclicos causaban la muerte de los animales en un periodo de 4 semanas. A su vez los compuestos polímeros alteraban el crecimiento y causaban diarreas.

La conclusión de este estudio, es que la toxicidad de las grasas calentadas es debido a la formación de monómeros cíclicos y la intensidad de los efectos observados depende del número de dobles enlaces que tenga la grasa inicial.

Lang (1973) encontró en pruebas de supervivencia e histológicas en ratas, que las grasas de fritura no muestran efecto nocivo alguno, aún en el caso de que contuvieran cantidades considerables de material oxidado y polimerizado.

Cuando se somete a aceites a sobrecalentamientos a altas temperaturas durante largos periodos inyectando oxígeno, llegan a contener hasta un 50% ó más de material polimerizado y pueden producir severa irritación gastrointestinal y diarrea (Morton, 1977). Normalmente aparecen retrasos en el crecimiento, y en casos extremos el animal muere (Crampton y col., 1956; Díaz-Alonso, 1977; Causeret y col., 1978).

Causeret y col. (1978) descubrieron que comparados con valores basales obtenidos con aceites frescos, la mortalidad perinatal aumentaba cuando las dietas que se administraban contenían aceites de linaza ó colza que habían sido calentados a 275°C durante 12 horas en atmósfera de nitrógeno. Los supervivientes fueron minuciosamente estudiados, observándose una hipertrofia hepática. Cuando los mismos aceites eran calentados a 200°C durante un total de 100 horas (un calentamiento continuo cada 8-10 horas) o bien 30 horas (un calentamiento continuo cada 30 minutos) e insuflando aire en los mismos, los efectos probados sobre crecimiento y

mortalidad eran menos dañinos que cuando los aceites habían sido calentados a 275°C. Estos autores señalan que los efectos negativos parecían ser causados por monómeros cíclicos que se producían durante el calentamiento, de cuya toxicidad informaron ya Crampton y col. (1953).

Varela (1980) señaló que realizando el proceso de fritura en condiciones normales y domésticas no se producían efectos tóxicos en animales de experimentación a los que se les administraba un aceite procedente de dichas frituras.

Márquez-Ruiz y col. (1990a) observaron que las grasas sometidas a condiciones termoxidativas drásticas pueden ser tóxicas para los animales de experimentación, sobre todo si se trata de grasas ricas en ácidos grasos poliinsaturados y más específicamente en ácido linolénico, sobre todo si se trabaja a temperaturas muy elevadas y en presencia de oxígeno, y si los animales sometidos a la experiencia son muy jóvenes o bien están sometidos a dietas deficientes de nutrientes.

Rodríguez y col. (1984) y Cuesta y col. (1988) indican que el tamaño hepático y cardiaco, así como los índices hepatosomáticos y cardiosomáticos fueron equivalentes en ratas alimentadas con aceite de oliva o plantina sin usar ó después de 30 frituras repetidas de patatas.

Sánchez-Muniz y col. (1991a) indican que las ratas hipercolesterolémicas que consumieron en su tratamiento para la normalización del colesterol plasmático, sardinas fritas en un aceite de oliva que había sido utilizado para tal fin, un número elevado de veces presentaron un índice relativo hepatosomático elevado respecto a las que consumieron sardinas fritas procedentes de la primera y segunda fritura en aceite de oliva. Dichos autores (Sánchez-Muniz y col., 1990a), encontraron en el aceite de oliva de freir sardinas un incremento no significativo de ésteres metílicos alterados con el número de frituras, por lo que sugieren que el posible daño hepático fue resultado de la ingesta de grasas alteradas.

En general, se observa que los estudios realizados con grasas de fritura, indican la ausencia de toxicidad en sentido estricto (Lang, 1973; Causeret y col., 1978 y Rodríguez y col., 1984) y sólo la utilización de dietas que contienen la fracción que no se une a la urea, resultan ser tóxicas cuando se administran a dosis muy elevadas (Nolen y col., 1967, Márquez-Ruiz y col., 1990a).

A pesar de todos estos efectos descritos, no es posible generalizar ni sacar conclusiones definitivas sobre la toxicidad de las grasas sobrecalentadas y procedentes de fritura, si bien en la mayoría de los casos friendo en buenas condiciones, sin abusar de un aceite, nunca se producen las alteraciones que tienen lugar con el sobrecalentamiento del mismo (Cuesta y col., 1988).

1.6.2. Efectos sobre lipemia y lipoproteínemia.

La fritura como ya hemos indicado, es un proceso culinario consistente en la introducción del alimento en un baño de aceite a una temperatura entre 170°C y 200°C. Se obtiene de esta forma un alimento frito de especiales características, entre las que destacaría su palatabilidad (Varela, 1980).

A pesar de la teórica alta temperatura alcanzada en el proceso, el daño térmico sufrido por el alimento es menor al que cabría esperar. La razón es que mientras dura la evaporación del agua, lo cual es necesario para que penetre la grasa caliente del baño de fritura, la temperatura no sube de los 100°C; y una vez que ha penetrado en el alimento la grasa caliente del baño, el tiempo que transcurre hasta que la fritura finaliza es relativamente corto.

Parece importante tanto para propósitos prácticos, como académicos, indicar qué cambios ocurren en las grasas durante la fritura y cómo afecta la ingestión de estas grasas al metabolismo lipídico ya que hay muchos estudios que describen los cambios sobre el metabolismo lipídico que produce la ingesta de aceites crudos o que no han sufrido calentamiento alguno, pero muy pocos aún sobre la incidencia de la ingesta de grasas usadas en frituras sobre dicho metabolismo.

Durante el proceso de fritura se alteran principalmente los ácidos mono y poliinsaturados de las grasas empleadas para este fin y por tanto, la ingesta de estas grasas respecto a las mismas crudas podría influir sobre los niveles de colesterol plasmático. Este efecto dependería en gran medida del tipo de aceite, cantidad y composición del alimento a freír y del tiempo y temperatura del proceso.

Simko y col. (1964) indican que grasas animales y aceite de girasol cocinados (p.e. fritos) elevan los niveles de Beta-lipoproteínas y colesterol.

Kritchevsky y Tepper (1967) administraron dietas durante un periodo de 8 semanas las cuales contenían colesterol y aceites de oliva y maiz crudos o bien oliva y maiz pero que habían sido calentados a 215°C durante 20 minutos. El consumo de aceite de oliva calentado, incrementó el colesterol plasmático en relación con el nivel obtenido con aceite de oliva crudo, además de incrementar los triglicéridos y disminuir los fosfolípidos. Sin embargo, la formación de ateroma fue mucho mayor en los animales que consumieron el aceite de maiz frito que en aquellos que fueron alimentados con el aceite de oliva frito.

En un experimento donde las ratas fueron alimentadas con distintas grasas calentadas (aceite de nuez, palma, soja y girasol) durante 13 semanas, Guillaumin y col. (1978) encontraron que los valores de colesterol, lípidos totales, triglicéridos y ácidos grasos libres eran similares a los valores basales en las ratas alimentadas con los mismos aceites sin calentar.

Varela (1980) no encuentra un incremento significativo en los valores del colesterol plasmático en ratas alimentadas con dietas que contienen aceite utilizado en fritura, incluso observa una disminución de estos niveles en ratas hembras.

Tomassi (1983) señala que el colesterol total y los triglicéridos disminuyen con la ingesta de la parte polimerizada y oxidada de un aceite de semilla de soja procedente de fritura.

Posteriormente, comparando los efectos de la ingesta de una grasa rica en ácidos grasos insaturados que había sido calentada repetidamente, con los efectos de la ingesta de la misma grasa cruda, Giani y col. (1985) no observaron ninguna diferencia sobre los niveles de colesterol plasmático, aunque sí un descenso sustancial en los triglicéridos.

Recientemente, Sánchez-Muniz y col. (1986) y Cuesta y col. (1987a) al comparar los efectos, en ratas wistar en crecimiento, de la ingesta durante 10 semanas, de aceite de oliva o de una grasa vegetal más saturada que dicho aceite, utilizadas ambas en 30 frituras repetidas de patatas con los efectos de la ingesta en otros lotes de ratas de las mismas grasas pero crudas, comprobaron un incremento significativo de colesterol total plasmático que se debía al incremento del colesterol esterificado, ya que el libre permanecía constante. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos de Glomset y Norum, (1973) en los que se describe que en las ratas juega un papel clave el enzima Lecitín-colesterol-acil-transferasa (LCAT), la

cual regula la transesterificación plasmática del colesterol libre, siendo las HDL el sustrato de esta reacción por lo cual, se incrementa el colesterol transportado por estas lipoproteínas de alta densidad, y se mantienen los niveles del colesterol libre plasmático. Por otra parte estos mismos autores (Sánchez-Muniz y col., 1986 y Cuesta y col., 1987a) encuentran en el estudio ya descrito, tras la ingesta de grasa procedente de fritura, una disminución de los niveles de VLDL plasmáticos. Este hecho puede relacionarse con una disminución de la síntesis de VLDL ó más probablemente por un aumento del aclaramiento de dicha partícula por el hígado, con lo cual se evitaría el paso de VLDL a LDL constituyendo por tanto este mecanismo una defensa en la tendencia a la elevación de colesterol total plasmático.

Otro aspecto que debería ser estudiado es el efecto del aumento de la peroxidación lipídica con la fritura y cómo ésta afecta a otros sistemas fisiológicos. Tenemos que considerar que hay procesos biológicos naturales en los que los procesos de peroxidación lipídica juegan un importante papel, por ejemplo, en la formación de prostaglandinas, aunque no son procesos citotóxicos, solamente cuando esta peroxidación lipídica sucede bajo condiciones que están fuera de control, se suceden las reacciones en cadena de radicales libres. La acumulación de peróxidos puede alterar el control homeostático de tromboxanos, leucotrienos, PGE₂ y prostaciclina, lo cual significaría que las dos primeras series de compuestos serían sintetizadas mientras que las dos últimas no se formarían, o lo harían en menor cantidad.

Esto es lo que parece haberse demostrado en el estudio dirigido por Giani y col. (1985) que examina la síntesis de prostoglandinas en plaquetas y el balance prostaciclina/tromboxanos que es considerado como clave en la formación de placas ateromatosas en la capa íntima de las arterias.

Estos estudios mostraron que los ácidos grasos poliinsaturados habían causado peroxidaciones "in vivo" que producían descenso en los niveles de tocoferol. Estos autores también señalaron un incremento de plaquetas y tromboxanos y un descenso en los niveles de prostaciclina en la capa íntima de la aorta, cuando grasas poliinsaturadas usadas en fritura eran consumidas. Un aporte de vitamina E restauró a valores normales el balance prostaciclina/tromboxano.

Por otro lado, las investigaciones han demostrado que ciertos estados patológicos (p.e. Diabetes) y la edad con niveles altos de lípidos peroxidados en suero, pueden jugar un papel importante en la aterosclerosis y

particularmente en la enfermedad coronaria ya que algunos estudios establecen que los productos de oxidación de lípidos procedente de la dieta son absorbidos a sangre y de ahí pasan al interior de órganos y tejidos. Así Yagi y col. (1981) demostraron que la administración intravenosa de hidroperóxidos del ácido linoléico a conejos, causaba lesiones en la capa íntima de la aorta, la cual se parece estrechamente al evento inicial de la enfermedad coronaria e incluye la adherencia de la agregación plaquetar.

Nishigaki y col. (1984) observaron que las LDL extraídas de un cultivo de células de músculo liso tenían aumentados sus niveles de lípidos peroxidados (hidroperóxidos de ácido linoléico).

Paralelamente Sasaguri y col. (1984) observaron al cultivar células endoteliales procedentes de cordón umbilical humano con 10 nmol/ml de hidroperóxido del ácido linoléico, durante 3 días, se producía daño celular incluyendo alargamiento y dilatación del retículo endoplasmático y vacuolización.

En una investigación posterior, estos mismos autores, (Sasaguri y col., 1985) compararon la capacidad que tenían los hidroperóxidos del ácido linoléico para producir lesiones en células endoteliales y células de músculo liso, resultando que las células de músculo liso son más resistentes al ataque de hidroperóxido del ácido linoléico que las células endoteliales, por esta razón la incorporación de las LDL por parte de las células de músculo liso y sus consecuentes transformación a "células espumosas" puede ser favorecida por la presencia de lípidos peroxidados.

Steinberg (1991) ha indicado que la progresión de la aterosclerosis puede ser inhibida en conejos Watanabe (animal modelo para el estudio de la aterosclerosis) mediante antioxidantes teniendo lugar dicho efecto sin disminución del colesterol sérico. Entre otros aspectos Steinberg (1991) indica que la producción de especies reactivas (radicales libres) derivados de oxígeno resultaría en modificaciones oxidativas de lipoproteínas, las cuales llevarían a cambios en sus propiedades biológicas. En contraste con las LDL nativas, las LDL oxidadas podrían contribuir al desarrollo de las células espumosas, llegando a ser quimioatrayentes, induciendo la expresión de factores de crecimiento y pudiendo ejercer efectos citotóxicos. Por tanto Steinberg y sus colaboradores (Parthasarathy y col., 1989 y Steinberg, 1991) proponen que los lípidos peroxidados serían los principales mediadores de la lesión del endotelio que inició la aterosclerosis.

Las fuentes de estos radicales libres derivados del oxígeno que producen la peroxidación lipídica permanecen sin identificar. Parthasarathy y col. (1989) proponen que la reacción de la lipoxigenasa pueda constituir una de las principales fuentes de radicales libres en células endoteliales.

1.6.3. Estudio Histológico.

La peroxidación lipídica es descrita comúnmente como un deterioro oxidante (oxígeno dependiente de la grasa), notable de los ácidos grasos insaturados. Dicha oxidación de los lípidos en sistemas biológicos puede tener profundas consecuencias. Así, como ya hemos comentado en el apartado 1.6.1.3., diferentes efectos tóxicos incluyendo irritación del tracto digestivo, agrandamiento de órganos, depresión del crecimiento e incluso muerte han sido observados, en animales de laboratorio a los que se administró grasas muy alteradas (oxidadas y sobrecalentadas).

Sin embargo, también señalábamos en dicho apartado que tales síntomas de toxicidad disminuían o no aparecían en animales alimentados con grasas comestibles que habían sido utilizadas en sistemas de fritura poco agresivos.

Los estudios histológicos constituyen sin duda un arma de diagnóstico y pronóstico muy extendida tanto en la clínica como en la experimentación, siendo normalmente estudiados especímenes del hígado, riñón, corazón, pulmones, cerebro, bazo, hipófisis, tiroides, timo, páncreas, adrenales, testículos, ovarios, así como otros muchos territorios de la economía.

Muchos estudios de citotoxicidad y carcinogenicidad relacionados con las grasas y particularmente con grasas peroxidadas, incluyen obligatoriamente al tejido hepático (Rodrigo y col., 1982, 1983 González y col., 1982) dado el papel central de dicho órgano en la economía y en particular sobre la lipogénesis, el metabolismo lipídico y lipoproteico y la detoxificación.

En dichos hígados no sólo se analiza su aspecto macroscópico, sino también mediante microscopía óptica detalles sobre el aspecto de los hepatocitos (vacuolización, eosinofilia, aspecto del núcleo/s), de los sinusoides, células de Kupffer, espacios porta, así como proceso de infiltración leucocitaria que puedan estar presentes y que informan de la extensión y gravedad de lesiones (p.e. relacionadas con procesos peroxidativos

"in vivo"), así como también informan de la capacidad regenerativa del hígado (p.e. ante el stress oxidante).

La microscopía electrónica es también fundamental en dichos estudios ya que los mecanismos de peroxidación de los lípidos de membrana resultan en una descomposición extensa de las membranas de las organelas sin evidencia de muerte celular.

2. OBJETIVOS E INTERES DEL TRABAJO.

Teniendo en cuenta lo reseñado anteriormente, esta Tesis Doctoral aborda los siguientes objetivos:

- 1- Analizar el efecto de la renovación frecuente de aceite de girasol sobre el rendimiento y vida útil de un aceite de girasol utilizado en frituras discontinuas y repetidas de patatas.
- 2- Estudiar los efectos del consumo de este aceite respecto al del mismo aceite sin usar sobre diferentes aspectos nutricionales y fisiopatológicos.

Para cubrir el primer objetivo se realizan 75 frituras repetidas de patatas evaluando la pérdida de aceite que se produce en cada fritura, así como los cambios ponderales de las patatas como consecuencia de la fritura. Se analiza el grado de deterioro del aceite por medio de índices físico químicos generales y por otros métodos que cuantifican más específicamente la alteración de las grasas debidas al proceso intrínseco de la fritura, como es la valoración del contenido polar total, para el que la legislación española ha establecido un límite de un 25% de este componente polar, sobrepasado el mismo una grasa de fritura debe ser rechazada. En este apartado se incide así mismo en la caracterización y cuantificación de los diferentes compuestos dentro de este contenido polar total.

El segundo objetivo profundiza en los efectos de dietas conteniendo aceite modificado por 75 frituras repetidas de patatas en comparación con una dieta conteniendo el aceite de girasol sin usar, sobre la ingesta, crecimiento, C.E.A, C.D.A para grasa y proteína de la dieta. A su vez se estudia la incidencia de ambas dietas sobre la lipemia y el metabolismo lipoproteico analizando la composición lipídica de las lipoproteínas séricas de dichos animales, así como los componentes lipídicos del hígado. El posible daño hepático producido por la ingestión de estas grasas termoxidadas se evalúa mediante un estudio histológico.

Pensamos que estos objetivos justifican la realización de esta Tesis.

3. MATERIAL Y METODOS.

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1.1. Condiciones de Fritura.

En esta experiencia, se ha utilizado para la realización de las frituras aceite refinado de girasol Koipesol de una acidez máxima de 0,2°.

El alimento escogido ha sido patatas nuevas. En cada una de las freidoras se puso una cantidad exactamente pesada (500 g) de patatas peladas, limpias y secas, cortadas en rodajas finas de aproximadamente 2mm de espesor.

Las patatas se frieron en dos freidoras domésticas (TAURUS) de tres litros de capacidad durante 75 frituras sucesivas, manteniendo constante el volumen del aceite del baño (3 litros), y la proporción grasa culinaria/alimento a freir en 3L/500 g mediante la adición de aceite de girasol crudo, es decir, sin usar, cada 4 frituras hasta la fritura 20. Después de la fritura 20 el volumen de cada freidora se completó cada 5 frituras, para conseguir 10 frituras por día, ya que la adición de aceite nuevo cada 5 frituras en lugar de cada 4 frituras no cambiaba los objetivos de la experiencia y sin embargo aceleraba el estudio. (ver esquema experimental de fritura, Esquema I).

Como ya hemos dicho, hasta la fritura 20, se hacían 8 frituras diarias, 4 frituras sucesivas por la mañana y tras dejar enfriar el aceite hasta una temperatura de 28-30°C se realizaban por la tarde las 4 frituras restantes. Posteriormente se dejaba enfriar durante la noche (aproximadamente 18 horas) el aceite de las freidoras a temperatura ambiente (equivalente 25°C) realizando las frituras 9 a la 16 en el segundo día siguiendo el mismo esquema que para las frituras 1-8.

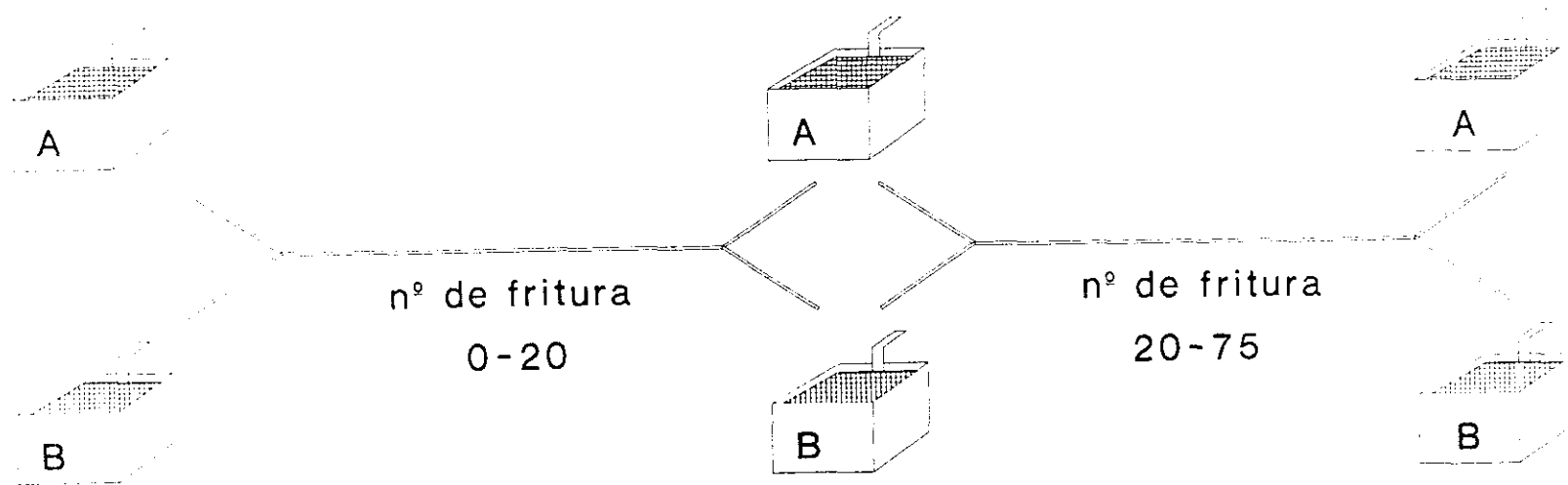
En el tercer día, durante la mañana se llevaron a cabo 4 frituras sucesivas (de la 17 a la 20) dejando enfriar el aceite hasta una temperatura de 28-30°C, y por la tarde 5 (de la 21 a la 25).

En el cuarto día se realizaron durante la mañana las frituras 26-30 dejando enfriar el aceite y por la tarde las frituras 31-35.

El quinto día se repitió el mismo proceso que el 4º día realizando las frituras 36-40 y 41-45.

Tras un periodo de descanso de 2 días consecutivos se concluyó la experiencia en los 3 días

ESQUEMA I-ESQUEMA EXPERIMENTAL DE FRITURA



- Hasta la fritura 20 se completó el volumen con aceite fresco cada 4 frituras; a partir de la fritura 20 se completó cada 5 frituras .
- Se tomaron 50 ml de aceite para su posterior análisis de las frituras nº 10, 20, 30, 40, 50, 65 y 75.

siguientes, realizando en cada uno de ellos las frituras 46-55, 56-65 y 66-75 respectivamente.

Es decir, las 75 frituras repetidas se realizaron siguiendo un proceso discontinuo con adición frecuente de aceite de girasol sin usar.

El tiempo total de calentamiento del aceite fue aproximadamente de 25 horas y 10 minutos. Cada 5 frituras la cantidad de aceite perdido fue aproximadamente del 9%, esto implica que la cantidad total de aceite nuevo añadido fue de 4,5 litros aproximadamente.

El alimento se añadió cuando el aceite alcanzó una temperatura estable de 180°C. Entre fritura y fritura, el tiempo que se requería para alcanzar esta temperatura fue de 10 minutos. La duración de cada fritura fue en todos los casos de 8 minutos; durante el 1º, 2º, 5º, 6º y 8º minuto, se controló la temperatura de la freidora.

Al finalizar las frituras 4ª, 8ª, 12ª, 16ª, 20ª, 25ª, 30ª, 35ª, 40ª, 45ª, 50ª, 55ª, 60ª, 65ª, 70ª y 75ª, se midió el volumen de aceite del baño, a fin de conocer el rendimiento ponderal de dicho aceite, durante las frituras repetidas.

3.1.2. Recogida, Preparación y tratamiento de los aceites

Se tomaron alicuotas del aceite después de las frituras 10, 20, 30, 40, 50, 65 y 75. Una vez frías se guardaron bajo atmósfera de nitrógeno a -20°C hasta su posterior análisis.

Paralelamente al proceso de fritura, se pesaron las patatas una vez fritas, después de las frituras 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 75.

En la tabla E, está esquematizada la metódica del proceso de fritura.

TABLA E: ESQUEMA DE LAS CONDICIONES DEL PROCESO DE FRITURA.

Nº. de freidoras	Dos
Material del recipiente	Aluminio
Capacidad del recipiente	3 litros
Grasa culinaria	Aceite refinado de girasol
Cantidad de patatas por fritura	500 gramos
Tipo de calentamiento	Discontinuo
Temperatura inicial del aceite.	180°C
Tiempo de fritura	75 periodos de 8 min. durante ocho días.
Muestras de aceite seleccionadas procedentes de la fritura Nº.	0, 10, 20, 30, 40, 50, 65 y 75.

3.1.3. Animales e Instalaciones

Los ensayos se llevaron a cabo en ratas Wistar, machos, en crecimiento con un peso inicial medio aproximado de 65 g, procedentes del criadero del Instituto de Nutrición y Bromatología (C.S.I.C - U.C.M) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. (U.C.M)

Durante el ensayo las ratas se alojaron en celdas metabólicas individuales mantenidas en una habitación termorregulada a $22,3 \pm 1,8^{\circ}\text{C}$ con un fotoperiodo de 12 horas y humedad entre 50-70%, condiciones que se mantuvieron durante toda la experiencia.

3.1.4. Dietas.

Se elaboraron dos dietas semisintéticas prácticamente isocalóricas, preparadas de acuerdo con las recomendaciones del National Research Council (1978).

La composición aproximada de las dietas fué:

- a) Proteína 14%
- b) Grasa 15%
- c) Corrector vitamínico 0,16%
- d) Corrector mineral 3%
- e) Fibra (celulosa) 5%
- f) Sacarosa 30%
- g) BHT y BHA 0,10% (0,05% BHT + 0,05% BHA)
- h) Almidón de trigo - c.s.p 100%

Las dietas difirieron únicamente en su fuente grasa. Las fuentes grasas utilizadas fueron aceite de girasol crudo "Koipesol" de acidez 0,2º y aceite frito procedente de 75 frituras.

El proceso de elaboración de las dietas fue el siguiente: se pesaron los componentes en las proporciones indicadas anteriormente, utilizando caseína láctica como fuente proteica y aceite crudo o procedente de 75 frituras respectivamente como fuente grasa.

Se añadió 0,2% de D, L- metionina (2% de la proteína total). El BHT y BHA, se utilizaron como antioxidantes.

De las dietas así preraradas se tomaron alicuotas por triplicado y se realizó en ellas las siguientes determinaciones: humedad, proteína total, grasa total, composición porcentual en ácidos grasos y cenizas, cuyos resultados se muestran en las tablas I y II.

La composición de los componentes vitamínicos y mineral se indican en las tablas III y IV.

Todas las dietas se conservaron en atmósfera de nitrógeno a 4ºC hasta su utilización.

Paralelamente se cogió dieta estándar de laboratorio (Sanders, Madrid) del criadero del Instituto de Nutrición y Bromatología (CSIC - UCM), que sirvió como dieta de referencia y cuyas características y composición se muestran en la tabla V.

TABLA I - CONTENIDO DE LA DIETA CON ACEITE DE GIRASOL CRUDO Y USADO EN 75 FRITURAS SUCEсивAS DE PATATAS Y KILOCALORIAS APORTADAS POR LAS MISMAS, EXPRESADO EN 100 g DE SUSTANCIA SECA.

	ACEITE CRUDO	ACEITE USADO EN 75 FRITURAS
Proteína (g)	13,82	13,62
Extracto Etereo (g)	14,54	14,62
Cenizas (g)	3,3	3,3
Humedad (%)	6,84	7,81

Kilocalorias aportadas:

	ACEITE CRUDO	ACEITE USADO EN 75 FRITURAS
Proteína	52,24	51,48
Extracto Etereo	130,86	131,58
Hidratos de carbono	237,52	237,98
TOTAL	420,62	421,04

TABLA II -COMPOSICION PORCENTUAL DE LOS ACIDOS GRASOS MAYORITARIOS DE LAS DIETAS CRUDO Y FRITURA 75 RESPECTIVAMENTE.

	CRUDO	FRITURA 75
Acido Palmítico C _{16:0}	6,76	5,95
Acido Esteárico C _{18:0}	3,79	4,18
Acido Oleico C _{18:1}	32,43	44,85
Acido linoléico C _{18:2}	55,52	43,20

TABLA III -CORRECTOR MINERAL (mg/100 g de dieta)

IK	0,021
FNa	0,243
$\text{CrO}_4 \text{ Na}_2$	0,110
$\text{SeO}_3 \text{ Na}_2$	0,024
$\text{SO}_4 \text{ Cu.5 H}_2 \text{ O}$	2,472
$\text{CO}_3 \text{ Zn}$	2,556
$\text{SO}_4 \text{ Mn H}_2 \text{ O}$	16,920
$\text{SO}_4 \text{ Fe.7H}_2 \text{ O}$	19,904
ClNa	90,630
$\text{CO}_3 \text{ Mg}$	76,978
$\text{SO}_4 \text{ Mg. 7 H}_2 \text{ O}$	225,0
$\text{PO}_4 \text{ HCa}$	680,0
$\text{PO}_4 \text{ H}_2 \text{ K}$	820,0
$\text{PO}_4 \text{ H}_2 \text{ Na}$	226,4
$\text{CO}_3 \text{ HK}$	610,3
$\text{CO}_3 \text{ Ca}$	1000,0

TABLA IV - CORRECTOR VITAMINICO PARA 1 Kg DE DIETA

Colina	1111,11 mg
Acido fólico	1,11 mg
Niacina (PP)	22,22 mg
Pantotenato Ca	8,88 mg
Riboflavina B ₂	3,33 mg
Tiamina B ₁	4,44 mg
Vitamina B ₆	6,66 mg
Vitamina B ₁₂	0,055 mg
Vitamina K (Menadiona)	0,055 mg
Vitamina E	33,33 U.I.
Vitamina A	4400 U.I.
Vitamina D ₃	1111 U.I.

TABLA V - COMPOSICION DE LA DIETA ESTANDAR DE LABORATORIO Y ANALISIS QUIMICO PORCENTUAL EN HUMEDAD, PROTEINA, GRASA, FIBRA, CENIZAS Y COMPOSICION PORCENTUAL EN ACIDOS GRASOS.

Composición:

Cereales	56
Subproductos de molinería de cereales	18
Harinas o tortas oleaginosas	14
Harinas de carne	3
Harinas proteicas de animales marinos	4
Compuestos minerales	2
Aglomerantes	2
Corrector mineral y vitamínico	<u>1</u>

100

Análisis Químico (%)

Humedad	13
Proteína	18,5
Fibra	5,0
Grasa	2,6
Cenizas	7,0

Tomado de alimentos para animales de laboratorio.
UNION ALIMENTARIA SANDERS S.A. Pinto (Madrid).

Composición porcentual de los Acidos grasos mayoritarios.

		%
Acido Mirístico	C _{14:0}	0,60
Acido Palmítico	C _{16:0}	13,20
Acido Palmitoléico	C _{16:1}	1,17
Acido Esteárico	C _{18:0}	2,55
Acido Oleico	C _{18:1}	25,66
Acido Linoléico	C _{18:2}	52,18
Acido Linolénico	C _{18:3}	3,13
Acido Erílico	C _{22:1}	0,33

3.1.5. Desarrollo de la experiencia

Tal como se muestra en el esquema experimental, (esquema II) la experiencia comprendió dos periodos: de adaptación (4 días) y experimental (28 días).

En el primer periodo las ratas se adaptaron al nuevo tipo de dieta y a las instalaciones. En el segundo periodo se separaron las ratas en dos lotes de 10 animales a los cuales se les administró dos dietas distintas: Dieta A, conteniendo aceite de girasol crudo y Dieta B, conteniendo aceite de girasol utilizado en 75 frituras de patatas.

Todas las ratas consumieron su dieta experimental y bebieron agua destilada "ad libitum".

Paralelamente se puso un lote Basal, de referencia, cuyas ratas comieron dieta estándar de laboratorio (Sanders, Madrid), y fueron sacrificadas después de los 4 días de adaptación.

En los últimos siete días se recogieron las heces, se pesaron y almacenaron a -18°C hasta su posterior análisis en bolsas individuales de plástico.

La extracción de sangre se realizó tras 18 horas de ayuno mediante punción de la arteria carótida bajo anestesia con pentobarbital sódico al 3% por vía intraperitoneal en dosis de 0.15 ml/100 g de peso. La obtención de suero se hizo por centrifugación de la sangre, después de su coagulación a temperatura ambiente, a 3000 r.p.m. durante 30 minutos.

Finalmente las ratas fueron sacrificadas para la extracción de los hígados. Parte de los mismos se pusieron en formol al 10% para su posterior estudio histológico y el resto se ultracongelaron en nitrógeno líquido y almacenaron individualmente a -20°C hasta su posterior análisis.

3.1.6. Parámetros Controlados

- Peso de los animales:

Las pesadas de los animales se realizaron individualmente en los días 1, 4, 7, 14, 21, 27 y 28 de la experiencia, empleando una balanza SAUTER KM-100 y ajustando la primera cifra decimal.

- Ingesta sólida:

Se realizó a diario, individualmente y por diferencia de peso entre el comedero lleno (ajustando a un peso determinado) y el comedero tras su ingesta. Se empleó una balanza SAUTER KM-100, ajustando hasta la segunda cifra decimal.

- En hígado se determinó:

Peso (se realizó inmediatamente después del sacrificio en balanza analítica SAUTER Gm bH D-7470, ajustando hasta la segunda cifra decimal), humedad, lípidos totales, colesterol total, fosfolípidos, triglicéridos y ácidos grasos hepáticos. Paralelamente se llevó a cabo un estudio histológico.

- En heces se determinó:

Peso en balanza SAUTER Gm bH D-7470, ajustando hasta la segunda cifra decimal, humedad, lípidos totales, proteína, nitrógeno, colesterol total y fosfolípidos.

- En plasma se determinó:

Colesterol (total, libre y esterificado), fosfolípidos, triglicéridos y composición de las lipoproteínas en colesterol (total, libre y esterificado), fosfolípidos y triglicéridos.

ESQUEMA II-ESQUEMA EXPERIMENTAL



ADAPTACION

4 Días

PERIODO EXPERIMENTAL

28 Días

Recogida de heces días 21-28

10 RATAS MACHOS - LOTE CRUDO

10 RATAS MACHOS - LOTE FRITURA 75



LOTE BASAL

4 Días

7 RATAS MACHOS - LOTE DIETA ESTANDAR DE LABORATORIO

-Ingesta, incremento de peso, CEA, PER.

-CDA grasa y proteina

★ SACRIFICIO, OBTENCION DE MUESTRAS Y ANALISIS

1) COLESTEROL, TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS EN SUERO,
LIPOPROTEINAS, HIGADO Y HECES.

2) HUMEDAD, GRASA, PROTEINA Y NITROGENO EN HIGADO
Y HECES .

3) COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS EN EL TOTAL HEPATICO.

4) ESTUDIO HISTOLOGICO.

3.2. TECNICAS ANALITICAS

3.2.1. Análisis en el aceite del baño de fritura

Se efectuaron análisis del aceite utilizado en las frituras, así como del aceite en crudo, que sirvieron como referencia para la evaluación de la alteración termoxidativa e hidrolítica producida en las frituras.

3.2.1.1. Variación de la temperatura durante el proceso de fritura.

La Temperatura del aceite se controló mediante termómetro graduado con una escala de 0°C a 200 °C. Al inicio de la fritura y en el 1º, 2º, 5º, 6º y 8º minuto de la misma.

3.2.1.2 Rendimiento

Se calculó teniendo en cuenta la pérdida de volumen del aceite de fritura durante las frituras 0-4, 4-8, 8-12, 12-16, 16-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45, 50-55, 55-60, 60-65, 65-70 y 70-75.

3.2.1.3 Estado del Aceite del baño de fritura

Se valoraron los cambios sufridos por el aceite mediante diversas técnicas a fin de caracterizar la alteración hidrolítica y termoxidativa, mediante la determinación de cambios físicos y químicos de la grasa sometida a un proceso controlado de fritura.

Algunos de los índices analíticos utilizados son clásicos en el estudio de las grasas y están normalizados; sin embargo es preciso referir estos índices a los valores de los mismos en la grasa original.

Los medios utilizados han sido clasificados en:

- Índices analíticos de carácter general (Apartado 3.2.1.3.1.).

- Métodos analíticos basados en la evaluación de la alteración total. (Apartado 3.2.1.3.2.).

3.2.1.3.1. Indices analíticos de carácter general

1a- Índice de refracción

Se determinó siguiendo la norma UNE 55-015 (1958).

El índice de refracción de una sustancia para una longitud de onda determinada, es la relación entre los senos de los ángulos de incidencia y de refracción que un rayo de luz, de esta longitud de onda, determina al hacerlo pasar del aire a la sustancia.

El índice de refracción se determinó a 25°C en relación a la línea D del sodio (= 589,3 nm), en este caso el símbolo n.

El material necesario para las determinaciones consistió en un refractómetro de prismas (Refractómetro de Abbe). El refractómetro utilizado estaba provisto de un sistema de compensación, puesto que se trabaja con luz blanca. La lectura exacta se realiza hasta la tercera cifra decimal.

1b- Índice de color

Se realizó, según la técnica de Wolff (1968), midiéndose la absorción de la muestra a 460, 550, 620 y 670 nm, en un espectrofotómetro UV/Vis, modelo Lambda 2 de la marca Perkin-Elmer, frente a tetracloruro de carbono.

Los cálculos realizados son los indicados por la American oil Chemists Society.

$$IC = 1,29 \times A_{460} + 69,7 \times A_{550} + 41,2 \times A_{620} - 56,4 \times A_{670}.$$

Siendo A la absorbancia en un espesor de 21,8 mm de aceite puro.

1c- Determinación de la acidez libre

Se realizó siguiendo las indicaciones recogidas en la Norma UNE 55-011 (1964).

Se denomina Grado de Acidez, al porcentaje de ácidos grasos libres que contiene un aceite o una grasa.

Para la determinación de la acidez libre, se utilizaron los siguientes reactivos: Alcohol etílico, éter etílico, disolución alcohólica de fenolftaleína al 1% y disolución valorada de Hidróxido potásico 0.5 N.

La acidez puede expresarse como índice de acidez. Tal índice se expresa como el número de mg de hidróxido potásico necesario para neutralizar los ácidos libres contenidos en 1 g de materia grasa.

El índice de áidez se calcula según la fórmula:

$$I A = \frac{56,11 \times V \times F}{G}$$

V = Volúmen de hidróxido potásico gastado.

F = Factor del hidróxido sódico.

G = Gramos de aceite.

1d. Medida Espectrofotométrico de la absorción en la región u.v. a 270 nm (K 270).

Esta determinación se realizó siguiendo las indicaciones recogidas en la NORMA UNE 55-047-73 (1973).

Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 270 nm con un espectrofotómetro monohaz PHILIPS modelo PU 8620/UV/VIS/NIR y cubetas prismáticas de cuarzo de 1 cm de espesor.

La absorbancia se controló mediante una disolución de dicromato potásico en hidróxido potásico 0,05 N al 0,01%. Para calcular K270 se utilizó la siguiente fórmula:

$$K = \frac{e_{\lambda}}{p} \times 100$$

siendo

K = Extinción específica a la longitud de onda.

e_{λ} = Extinción leída en el aparato

p = Peso de la muestra en miligramos.

3.2.1.3.2. Métodos analíticos para la evaluación de la alteración total.

2a- Determinación cuantitativa de los triglicéridos no polares y de compuestos polares del aceite.

Se realizó utilizando una ligera modificación de las técnicas de separación cromatográfica normalizadas por la I.U.P.A.C. en 1981, y que recogen Walthing y Wessels (1981) y recientemente en B.O.E (Ministerio de Relaciones con las Cortes y de Secretaria del Gobierno, 1.989).

El fundamento de este método consiste en realizar una separación global de los triglicéridos que permanecen inalterados de aquellos compuestos que han sufrido alteración al menos en uno de sus restos acilos, mediante elución con éter de Petróleo: éter etílico 87:13 para aceites no usados o poco alterados, y éter de petróleo: éter etílico 90:10 para aquellos aceites más alterados. (Pérez-Camino, 1986). Posteriormente se eluye con éter etílico, determinándose ambas fracciones gravimétricamente.

Material y reactivos

- Columna de vidrio de 45 cm de altura, 1,6 cm de diámetro interno y llave de teflón.

- Silicagel 60. Se deseca en estufa a 160°C durante al menos 4 horas, para en el momento de su uso ajustar el contenido de agua al 5%. Finalmente se agita vigorosamente el recipiente hasta que la sílice no quede

adherida a las paredes (durante unos 10 minutos).

- Mezcla de elementos: éter de petróleo (de punto de ebullición 40-60)/éter etílico 87:13 y 90:10, (Carlo Erba).

- Arena de mar, reactivo para análisis (Merck).

- Placas para cromatografía en capa fina de 0,5 mm de espesor (Merck).

Preparación de la columna

Se pesan 20 g de silicagel hidratado con un contenido en agua del 5% y se añaden 45 ml de éter de petróleo/éter etílico 87:13. La mezcla se transfiere a la columna en cuyo fondo previamente se ha colocado una bola de algodón humedecido en la mezcla eluyente, eliminándose el disolvente en exceso sin que en ningún momento deje de cubrir la sílice y agregándose finalmente 2 g de arena de mar. La altura de la columna de sílice es de 30 cm.

Por último se lavan las paredes de la columna, con el mismo disolvente y se elimina disolvente, abriendo la llave de teflón hasta que éste alcance la altura de la arena.

Procedimiento operatorio

Se pesa 1 g de muestra, con la exactitud del mg en un matraz. Se le añade 5 ml de la mezcla éter de petróleo/éter etílico. El contenido se recoge con una pipeta Pasteur y se transfiere a la columna. El matraz se lava con otros 5 ml de mezcla transfiriéndose a la columna.

Una vez la muestra en la columna, se hace eluir el disolvente hasta que alcance la altura de la arena.

A continuación los componentes no polares se eluyen con 150 ml de éter de petróleo/éter etílico 87:13 para aceites no usados y 90:10 para aceites alterados, recogiendo el contenido en un matraz de 250 ml pesado con la exactitud del miligramo, ajustándose el flujo para que los 150 ml pasen a través de la columna en unos 30 minutos.

La elución de los componentes polares se realiza de igual forma con 150 ml de éter etílico, que se recogen

en otro matraz, previamente tarado.

El disolvente de ambas fracciones, no polar y polar, se elimina utilizando un rotavapor con baño de agua a 35 °C, bajo corriente de Nitrógeno. Una vez evaporado el disolvente, se pesan los matraces y se determinan por diferencia los pesos de ambas fracciones.

Valoración de la eficacia de la columna cromatográfica

La eficacia de la separación debe ser comprobada por cromatografía en capa fina. Para ello, se diluyen las dos fracciones polar y no polar al 10% en hexano: éter etílico 80:20 y se aplican 20 ml de estas soluciones sobre placas de silicagel 60 F254, de 0,5 mm de espesor de la casa Merck, utilizando como líquido eluyente hexano: éter etílico: ácido acético 80:20:1.

La visualización de las manchas se realiza con vapores de yodo.

2b - Determinación de los ésteres metílicos no alterados y alterados del aceite mediante cromatografía de absorción en gel de sílice.

Esta determinación, al tiempo que mantiene la reproducibilidad del método anterior, proporciona una medida más exacta de la separación cromatográfica, ya que se simplifica la estructura de los compuestos existentes en la muestra (Dobarganes y col., 1984; Pérez-Camino, 1986). Para ello se procedió a saponificar la grasa y metilarla posteriormente con trifluoruro de boro en metanol (Metcalf y col. 1966).

Procedimiento operatorio

Se pesa un gramo de grasa en un matraz de 100 cc al que se le añaden 5 ml de Hidróxido Sódico en metanol 0,5 N, calentándolo a 60°C durante 90 minutos y agitando de vez en cuando.

Posteriormente se adicionan 2 ml de benceno y 4 ml de trifluoruro de boro en metanol y se calienta a 90°C durante 30 minutos. Se deja enfriar el matraz hasta temperatura ambiente y se añaden unos mililitros de solución acuosa saturada de cloruro sódico.

A continuación se extraen los ésteres metílicos añadiendo 5 ml de hexano, agitando y recogiendo con una pipeta Pasteur la fase superior. Esta operación se repite sucesivas veces. Finalmente se evapora el disolvente en un rotavapor, bajo corriente de Nitrógeno.

Las muestras una vez metiladas se someten a cromatografía en columna de gel de sílice, a fin de separar los ésteres metílicos no alterados de los alterados. Para ello se ha seguido las indicaciones de Pérez-Camino (1986).

Esta determinación se ajusta a las condiciones recomendadas para la determinación del porcentaje de triglicéridos, no polares y polares por la IUPAC y que recogen Waltking y Wessels (1981), y el B.O.E., (Ministerio de Relaciones con las Cortes y de Secretaría del Gobierno, 1989), excepto en la relación éter de petróleo/éter etílico que es de 95:5)

2c- Determinación del contenido relativo y absoluto de ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía gaseosa.

La cromatografía de gases es una técnica de separación basada en la distinta velocidad de migración de cada uno de los componentes de una muestra compleja, en estado gaseoso, a lo largo de un medio estacionario formado por una columna cromatográfica, por la que pasa un gas portador inerte (en nuestro caso, Nitrógeno). Mediante un detector de ionización de llama, dispuesto al final de la columna se evalúa la cantidad de moléculas de los distintos componentes frente al tiempo y se obtiene un cromatograma.

El cromatógrafo utilizado realiza una cromatografía gas-líquido, en la que la fase estacionaria es una disolución retenida en el seno de la columna, y su funcionamiento se basa en fenómenos de participación o reparto.

Procedimiento Operatorio

Para el análisis cromatográfico, se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5710 A, con detector de ionización de llama. Las columnas fueron de acero inoxidable de 2 m de longitud y 1/8 de pulgada de diámetro interno. La fase estacionaria usada fue Supelcoport 2330 al 10% sobre Chromosorb W AW 100-120 (Supelco).

Las áreas de los picos se calcularon mediante un integrador Hewlett-Packard, modelo HP-3394 A.

El gas vector utilizado fue Nitrógeno con un flujo de 30 ml/min y el de Hidrógeno de 60 ml/min. El flujo de aire fue de 210 ml/min.

La temperatura de trabajo de la columna se programó isotérmicamente a 170°C durante 8 minutos. Posteriormente se elevó a razón de 1°C por minuto hasta llegar a 240°C, temperatura en la que se mantuvo 4 minutos.

La sensibilidad del electrómetro se regló en posición 10 y la atenuación en 4.

La identificación de los picos se realizó atendiendo al tiempo de retención relativo y absoluto de patrones conocidos (Sigma). La cuantificación de los diferentes ácidos grasos se realizó sólo en la fracción de ésteres metílicos no alterados, según indican (Pérez-Camino, 1986; Pérez-Camino y Col., 1987; Sánchez Múniz y col., 1989). La ventaja de esta modificación, estriba en que de esta forma se evita la contaminación de la columna y del detector del cromatógrafo de grasas, por los ácidos oxidados, dímeros y compuestos de elevado peso molecular presentes en la muestra alterada que no eluyen en las condiciones de análisis. Los valores obtenidos mediante la adición de patrón interno y mediante este procedimiento según Pérez-Camino (1986), son similares.

El cálculo de la cantidad de ácido se realiza mediante la siguiente operación:

Cantidad de ácido A(en mg/100 mg de aceite) =

$$= \frac{\% \text{ Acido A} \times \% \text{ de E.M.no alterados}}{100}$$

2d -Determinación de los diferentes productos de alteración termoxidativa e hidrolítica.

Para esta determinación se utilizó una combinación de las técnicas de cromatografía en columna y cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión por tamaño de partícula (HPSEC).

La técnica de cromatografía en columna descrita en el apartado (3.2.1.3.2.) se utiliza con objeto de

concentrar la muestra en sustancias polares (Dobarganes y col., 1988).

La HPSEC es una técnica cromatográfica que separa los distintos componentes de una mezcla compleja en función de su peso molecular. Las sustancias de mayor peso molecular eluyen las primeras mientras que las de menor peso molecular tardan más en eluir, debido a que penetran en los poros del gel que constituye la fase estacionaria y así su salida es retardada. La fase móvil es un disolvente en régimen isocrático y con flujo determinado.

Procedimiento Operativo

La muestra de grasa fue separada mediante cromatografía en columna, en dos fracciones correspondientes a los compuestos no polares y polares respectivamente, siguiendo el método indicado en el apartado (3.2.1.3.2)

Para comprobar la eficacia de la separación, se utilizó la cromatografía en capa fina como también se indica en el mismo apartado.

La fracción que contenía los compuestos polares, una vez evaporado el disolvente bajo corriente de nitrógeno, fue disuelta en tetrahidrofurano con grado HPLC (Panreac); la concentración de la muestra fue de 10-15 mg/ml de tetrahidrofurano.

Las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo Konik 500 Å con un "loop" de 10 µl de muestra. Se utilizaron 2 columnas GPC (Hewlett Packard) con tamaño de poro de 50 y 100 Å respectivamente, conectadas en serie y operando a 45°C. El tamaño de partícula de las columnas fue de 5µ.

Como fase móvil se utilizó tetrahidrofurano con grado de HPLC y con un flujo de 1 ml/min.

Se utilizó un detector de índice de refracción Hewlett Packard 1037 A.

Para el control de calidad de dicha técnica se estudiaron por separado diferentes concentraciones de la fracción polar y de estándares de ácidos grasos (oleico, linoléico, palmítico y esteárico), de diglicéridos (dioleína, dilinoleína, dipalmitina y diestearina), de triglicéridos (trioleína, trilinoleína, tripalmitina y triestearina). Todos estos estándares procedían de la casa SIGMA, Alcobendas (Madrid).

Posteriormente se hicieron análisis de regresión entre la respuesta del detector de índice de refracción y los μg de los diferentes grupos de componentes inyectados. La respuesta fue bastante lineal ($r > 0,98$) en todos los casos siendo el factor de respuesta para los ácidos grasos, diglicéridos, triglicéridos y el total de componentes polares similar.

Debido a la inexistencia de estándares de polímeros de triglicéridos y dímeros de triglicéridos y dado que cada pico corresponde a un grupo complejo de componentes (p.e. El pico de triglicéridos oxidados contiene triglicéridos oxidados que pueden tener 1, 2 ó 3 restos acilos oxidados), se aceptó el mismo factor de respuesta para polímeros de triglicéridos y dímeros de triglicéridos que para otros compuestos (triglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos libres).

3.2.2. Análisis de las Dietas

3.2.2.1. Humedad

Se determinó en alicuotas, por pérdida de peso en estufa a 105°C hasta peso constante. (A.O.A.C. 1975).

3.2.2.2. Proteína

Se determinó el Nitrógeno por el método Kjeldalh, utilizando un autoanalizador Kjeldalh modelo AUTO 1030 (Tecator, Suecia). El factor conversión a proteína utilizado fue 6,25.

3.2.2.3. Grasa

Se determinó mediante la técnica de Soxhlet en una unidad de extracción 1040, modelo SOXTEC SYSTEM (Tecator, Suecia). Como líquido de extracción se empleó éter de petróleo (rango de ebullición $40-60^{\circ}\text{C}$).

3.2.2.4. Cenizas

Se determinó mediante incineración en mufla a $450-500^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante (A.O.A.C 1975).

3.2.3. Análisis en Suero, Hígado y Heces

3.2.3.1. Humedad

Se tomaron alicuotas por duplicado de hígado y heces y se determinó en ellas la humedad por pérdida de peso en estufa a 105°C hasta peso constante. (A.O.A.C. 1975).

3.2.3.2. Proteína

Se determinó exclusivamente en heces, mediante el método Kjeldahl, utilizando un autoanalizador Kjeldahl modelo AUTO 1030 (Tecator, Suecia), multiplicando por el factor 6,25 para su conversión a proteína (A.O.A.C. 1975).

3.2.3.3. Lípidos Totales

En hígado y heces, el contenido lipídico total se determinó por pesada del extracto clorofórmico evaporado a sequedad, obtenido siguiendo una ligera modificación del método de Bligh y Dyer (1959) y posterior purificación según el método de Folch y col. (1957). Dicha determinación se realizó atendiendo al esquema N°. 1. Este extracto lipídico purificado se diluyó con 10 ml de cloroformo. Esta disolución clorofórmica se guardó a -20°C en tubos con tapón de rosca y teflón bajo atmósfera de Nitrógeno hasta su análisis.

Una parte alicuota de este extracto clorofórmico, se utilizó para las determinaciones enzimáticas posteriores de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos.

3.2.3.4. Separación de Lipoproteínas

La separación de las distintas fracciones lipoproteicas se realizó mediante ultracentrifugación. Esta técnica permite la separación de las distintas lipoproteínas en función de su diferente densidad.

- VLDL : $0.950 < d < 1,0063$ g/ml
- LDL: $1,0063 < d < 1,057$ g/ml
- HDL: $1,057 < d < 1,21$ g/ml

4-(p - Benzoquinona - monoimina)- Fenazona)

La concentración de colesterol total es proporcional a la concentración de este derivado fenazónico, compuesto que permite su lectura espectrofotométrica y, con ello conocer la concentración del primero.

En nuestro caso utilizamos el Kit de Boehringer, Mannheim (Nº. 147549), compuesto por las siguientes soluciones:

a) Solución 1: Tampón fosfato de potasio: 0,4 mol/l, pH 7,7; Fenol: 20 mmol/l y Metanol: 1,85 mmol/l.

b) Solución 2: Tampón fosfato de potasio: 0,4 mol/l, pH 7,7; 4-amino-fenazona: 2 mmol/l; Metanol: 1,85 mol/l y Hidroxipolietoxidodecano: 0,4%

c) Solución 3 - Compuesta por los enzimas: colesterolesterasa (produce la hidrólisis de los ésteres de colesterol), colesteroxidasa (origina colestenona por oxidación del colesterol liberando agua oxigenada) y peroxidasa (origina 4-(p-benzoquinina monoimino)-fenazona a partir de 4-aminofenazona y el agua oxigenada liberada por la acción de la anterior enzima).

Las determinaciones se realizaron directamente utilizando 10 microlitros de muestra problema y 1 mililitro de mezcla reactiva (mezcla de las tres soluciones anteriores).

Las muestras se mantuvieron en incubación durante 5 minutos a 37°C y se leyó su absorbancia frente a un blanco a 500 nm. en un espectrofotómetro PHILIPS PU 8620/UV/VIS/NIR.

3.2.3.6. Determinación de Colesterol Libre

En suero, lipoproteínas e hígado se determinó el contenido de colesterol libre.

El fundamento es similar al anterior. Pero, en este caso, la solución 3 del Kit comercial está compuesta sólo por: colesteroxidasa y peroxidasa.

Al carecer de colesterolestearasa no se produce la hidrólisis de los ésteres del colesterol y sólo se determina el colesterol libre.

El Kit comercial utilizado fue de Boehringer Mannheim, N° 123.431). La absorbancia se leyó a 500 nm en un espectrofotómetro PHILIPS PU 8620/UV/VIS/NIR, en cubeta de 1 cm de peso de luz.

3.2.3.7. Determinación de Colesterol Esterificado

En suero, lipoproteínas e hígado, se determinó el contenido de colesterol esterificado.

Se realizó por diferencia entre el colesterol total y el colesterol libre.

3.2.3.8. Determinación de Fosfolípidos

En suero, lipoproteínas, hígado y extracto lipídico de heces, se determinó el contenido de fosfolípidos.

La medida de este parámetro, se realizó siguiendo el método enzimático colorimétrico comercializado por Boehringer Mannheim (N° Kit 691844), compuesto por las siguientes soluciones:

a) Solución 1: Tampón: Tris (hidroximetil) amino metano: 50 mmol/l; pH 8,0 y Fenol: 20 mmol/l.

b) Solución 2: Fosfolipasa D: > 1000 μ /l; Colinoxidasa: > 1400 μ /l; Peroxidasa: > 800 μ /l y 4-aminofenazona: 8 mmol/l.

c) Solución 3: colincloruro: 54,1 mg/dl.

Se basa en que los fosfolípidos son hidrolizados por el enzima fosfolipasa, obteniéndose un compuesto coloreado mediante reacción con un cromógeno y en presencia de una peroxidasa.

Las lecturas de absorbancia se realizaron a 500 nm en un espectrofotómetro PHILIPS PU 8620 UV/VIS/NIR, obteniéndose así las concentraciones expresadas en mg/dl y mmol/l de fosfolípidos.

3.2.3.9. Determinación de Triglicéridos

En suero y lipoproteínas se determinó la concentración de los triglicéridos empleando un Kit enzimático comercial (Nº. 701904, Boehringer Mannheim, R.F.A), compuesto por las siguientes soluciones:

a) Solución 1: Tampón Tris (0,15 mol/l; pH 7,6; sulfato de magnesio: 17,5 mmol/l; EDTA, sal disódica: 10 mmol/l; 4-clorofenol: 3,5 mmol/l; Colato sódico: 0,15%; Ferrocianuro Potásico: 6 mol/l; Eter poliglicólico de alcohol graso: 0,12%.

b) Solución 2: ATP > 0,5 mmol/l; 4-aminofenazona: 0,35 mmol/l; Lipasa > 3 U/ml; glicerol-fosfato-oxidasa > 2,5 U/ml; glicerol quinasa > 0,2 U/ml; peroxidasa > 0,15 U/ml.

La medida se basa en la hidrólisis enzimática de los triglicéridos con liberación de glicerol libre, que posteriormente se fosforila mediante la glicerolquinasa, dando lugar a un compuesto coloreado cuya evaluación espectrofotométrica a 500 nm permite la determinación cuantitativa de los triglicéridos.

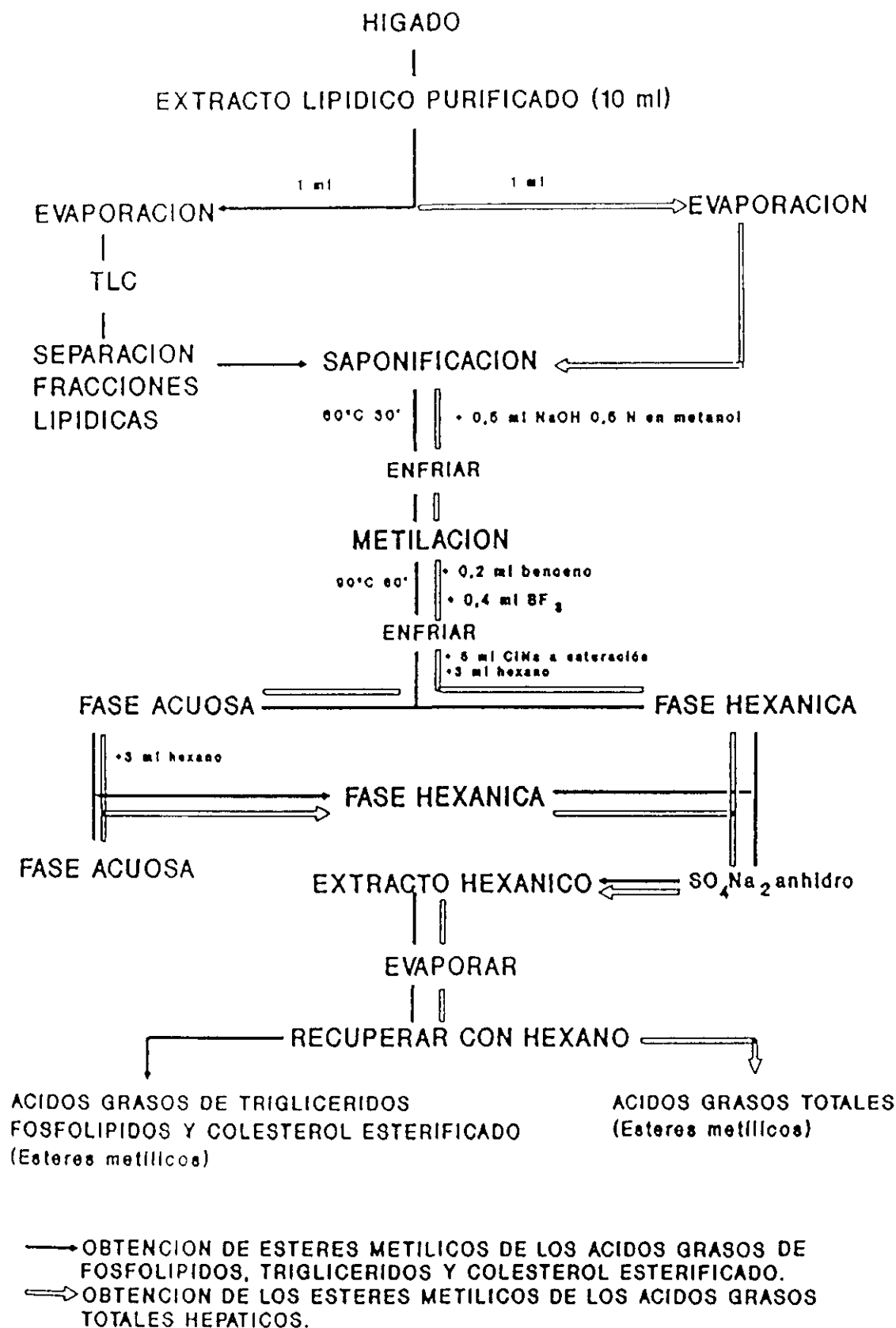
Las muestras se incubaron con los reactivos adecuados durante 10 minutos a 20-25°C y se leyeron las absorbancias a 500 nm. (Espectrofotómetro PHILIPS PU 8620 UV/VIS/NIR).

En hígado se determinó tal y como indican Quazi y col. (1983) restando a los lípidos totales la suma de fosfolípidos más colesterol total.

3.2.3.10. Obtención de Esteres Metílicos en Hígado. Determinación de ácidos grasos en hígado por Cromatografía Gaseosa.

Para la obtención de ésteres metílicos de los ácidos grasos totales hepáticos, se procedió a la saponificación y metilación de una alícuota del extracto clorofórmico hepático (apartado 3.2.3.3.), siguiendo la técnica de Metcalfe y Col. (1966) modificada por Higón (1985). Dicho procedimiento aparece en el esquema Nº. 2.

ESQUEMA N° 2. OBTENCION DE ESTERES METILICOS.



Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5710A con detector de Ionización de llama. Las columnas fueron de acero inoxidable de 2 metros de longitud y 1/8 pulgadas de diámetro interno.

La fase estacionaria utilizada fue supelcoport 2330 al 10% sobre Chromosorb W A W 100-120 (Supelco, España).

Las áreas de los picos se calcularon con un integrador Hewlett-Packard HP 3394AA.

El transporador utilizado fué nitrógeno con un flujo de 30 ml/min. y aire hasta 300 ml/min.

La temperatura de trabajo de la columna se programó manteniéndose durante 8 minutos a 170 °C y elevándose a razón de 2°C/min, hasta 240°C donde se mantuvo durante 4 minutos. La temperatura del detector fue de 300°C y la del inyector de 250°C.

La sensibilidad del electrómetro se fijó en posición 10 y la atenuación en 4.

Se inyectan 0,5 microlitros del extracto hexánico, concentrado mediante microjeringa Hamilton de 5 microlitros.

Bajo estas condiciones se obtuvieron una buena separación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, identificándose por sus tiempos de retención, absolutos y relativos frente a estándares de ácidos grasos (SIGMA, Alcobendas, Madrid).

El control de calidad de la técnica y control de identificación de los ácidos grasos fué el descrito por Higón (1985) y por Medina San Nicolás (1986).

3.2.3.11. Estudio Histológico

Como ya se ha comentado, parte del material hepático se puso en formol al 10% para la realización de una detallada inspección macroscópica para el estudio histológico de los mismos.

Dicho estudio se realizó en el departamento de Patología Animal II (Facultad de Veterinaria de Madrid, U.C.M.).

Las muestras destinadas para este estudio fueron talladas a un tamaño de 1-2 cm de espesor y fijadas en formol al 10%; a continuación se incluyeron en parafina

sintética "Histotec pastillas" (Merck), cuyo grado de solidificación varía entre 56-58°C. El procesador automático de tejidos que se utilizó fue un "Shandon-Elliott Bench SCE 0400".

Para la obtención de cortes seriados de 4-5 μm de espesor se empleó un microtomo "Minot Leitz 1516" con motor incorporado.

Las preparaciones se tiñeron mediante la técnica general de coloración: - Hematoxilina-eosina

Para la observación se utilizó un microscopio Ortho-plan (Leitz) con sistema de luz polarizada y epifluorescencia incorporada, realizándose las microfotografías con un film de Kodak Ektachrome.

3.2.4. Control de Calidad

Se siguieron las normas de control de calidad del LIPID RESEARCH CLINICS PROGRAM, tal y como describe Cava (1986).

Como control externo de cada parámetro analítico sometido a control, se utilizó por duplicado sueros control de la casa Boehringer, Mannheim (Precilip) para la determinación de triglicéridos y fosfolípidos y Kontrollogen de la casa Behring para la determinación de colesterol (total y libre).

Para la determinación de colesterol total y fosfolípidos en hígado se utilizaron soluciones clorofórmicas de estándares lipídicos de concentración conocida (MERCK, España).

Paralelamente se utilizó un "pool" de sueros de referencia, obtenido por mezclas de sueros que se dividió en alícuotas y se almacenó a -20°C en tubos eppendorf hasta su análisis.

Las determinaciones de dicho "pool" se realizaron a lo largo de 7 días, para la elaboración de las cartas de control y posteriormente, durante el estudio se tomaron como control interno.

Como criterio de rechazo de resultados se usaron las multirreglas de WESTGARD detalladas por Garrido (1986) y Castro (1986).

3.3. INDICES UTILIZADOS

3.3.1. COEFICIENTE DE EFICACIA ALIMENTARIA (C.E.A)

Obtenido como el cociente entre el incremento de peso y los gramos de dieta ingeridos sobre sustancia seca.

3.3.2. COEFICIENTE DE EFICACIA PROTEICA (P.E.R)

Se obtiene como el cociente entre el incremento de peso y los gramos de proteína ingeridos sobre sustancia seca.

3.3.3. COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD APARENTE O UTILIZACION DIGESTIVA.

Es el porcentaje de los gramos absorbidos de un nutriente respecto a los gramos ingeridos.

$$CDA = \% \quad A/I = \frac{I - F}{I} \times 100$$

A = gramos absorbidos
I = gramos ingeridos
F = gramos eliminados por heces

Este coeficiente se estudió tanto para la grasa como para la proteína.

3.3.4. INDICE HEPATOSOMATICO

Se calcula dividiendo el peso del hígado (sobre sustancia fresca) por el peso corporal, multiplicando el resultado por 100.

$$I.H. = \frac{P}{Pc} \times 100$$

P = Peso Hígado en gramos

Pc = Peso corporal en gramos

3.4. TRATAMIENTO ESTADISTICO

El estudio estadístico de los datos se llevó a cabo en primer lugar analizando el tipo de distribución de las distintas variables en la muestra, de lo que se obtuvo que, aunque los grupos o unidades de análisis eran pequeñas cada una de las variables en el conjunto de la muestra seguía una distribución considerable como normal, por lo que optamos por la realización de pruebas paramétricas asumiendo la normalidad en los grupos, cuyos resultados validaríamos siempre con tests paramétricos.

En el tratamiento estadístico sobre las ratas se incluyeron análisis de varianza-covarianza (ANOVA) apropiados para las casillas de igual o distinto tamaño, con varias fuentes de variación: tipo de alimentación, tamaño de los animales, tiempo de experiencia, con objeto de conocer los cambios imputables al tipo de dieta, respecto a un lote de referencia basal. Las comparaciones entre grupos se efectuaron mediante el test de DUNCAN.

Para el estudio estadístico de las muestras de aceites se realizó análisis de varianza, ANOVA de una vía de muestras repetidas seguido del Test múltiple comparaciones de Newman-Keuls.

Además se utilizó el Test de las correlaciones producto-momento de Pearson.

El nivel mínimo de significación se estableció en el 5% y se expresará en todos los casos señalando $p < 0,05$.

La codificación de los datos se realizó en un ordenador IBM 4381, modelo 22, cuyo sistema operativo es un V.M./S.P y bajo la dirección de la Licenciada en Ciencias Matemáticas y Analista de servicios informáticos, del Centro de Proceso de Datos de la Universidad Complutense de Madrid, D^a. M^adel Carmen Bravo Llatas.

El cálculo estadístico se realizó con ayuda de los programas de la serie SAS, versión 5,18 (Sas Institute, North Carolina, 1988) y con la ayuda del Programa EPISTAT. (Tracy L Gustafson M.D. 1987) desarrollado en un ordenador personal Tandon PS 12.

Las gráficas se realizaron utilizando el programa Harvard Graphics desarrollado para esta labor el ordenador PC-Olivetti, Personal Computer M240.

Las correlaciones se obtuvieron mediante el programa Microstat especialmente diseñado para ello sobre el PC-Olivetti Personal Computer M240.

4. RESULTADOS

4.1. EXPRESION DE RESULTADOS.

Como se ha comentado en el apartado 3.1 para cubrir nuestros objetivos se han llevado a cabo dos diseños experimentales diferentes que denominaremos, Esquema I y Esquema II.

El Esquema I se refiere al diseño experimental de la fritura y al tipo y forma en que se ha llevado a cabo la fritura de patatas.

En el Esquema II el lote que ingiere aceite de girasol crudo se abrevia como lote crudo. Cuando la dieta ingerida contiene aceite de girasol procedente de setenta y cinco frituras sucesivas de patatas se abrevia como lote fritura 75.

También se recogen datos de los animales de partida de aproximadamente 65 g de peso. Estos animales que denominamos lote Basal, reciben durante el periodo de adaptación dieta estándar de laboratorio.

Los valores representan el valor medio \pm el error estándar de las determinaciones indicadas en cada caso, señalándose también las diferencias significativas encontradas mediante el empleo de supraíndices.

Las tablas 1-20, gráficas 1-14 y figura 6, corresponden al esquema experimental I y en ellas se representan las alteraciones encontradas en el aceite durante diferentes sucesivas frituras.

Las tablas 21-38, gráficas 15-45 y figuras 7-23, corresponden al esquema experimental II y detallan los resultados derivados de la ingesta de dietas conteniendo dieta basal o dieta con aceite de girasol crudo y aceite de girasol sometido a 75 frituras de patatas.

TABLA 1 - EVOLUCION DE LA TEMPERATURA DEL ACEITE DE GIRASOL DEL BAÑO
DE FRITURA DURANTE 75 FRITURAS SUCESIVAS DE PATATAS

NUMERO DE FRITURA	NUMERO DE DETERMINACIONES	TIEMPO (minutos)					
		1	2	5	6	8	
1	2	156,00 ± 4,00	147,00 ± 5,00	144,50 ± 2,50	145,50 ± 1,50	145,00 ± 1,00	
10	2	154,00 ± 6,00	146,00 ± 6,00	143,50 ± 1,50	146,50 ± 2,50	152,00 ± 2,00	
20	2	153,50 ± 1,50	144,00 ± 0,00	140,50 ± 0,50	142,50 ± 1,50	147,50 ± 4,50	
30	2	159,50 ± 0,50	150,00 ± 1,00	145,50 ± 3,50	150,50 ± 5,50	154,50 ± 5,50	
40	2	145,50 ± 0,50	140,00 ± 4,00	143,00 ± 3,00	146,50 ± 2,50	152,50 ± 3,50	
50	2	156,00 ± 0,00	151,00 ± 0,50	147,00 ± 7,00	150,00 ± 6,00	160,00 ± 4,00	
60	2	155,00 ± 3,00	142,00 ± 0,00	143,50 ± 2,50	145,00 ± 5,00	151,00 ± 5,00	
75	2	153,00 ± 5,00	147,50 ± 2,50	142,00 ± 2,00	144,00 ± 2,00	151,00 ± 1,00	

Los valores representan la media ± el error estándar de 2 determinaciones.

TABLA 2 - RENDIMIENTO DEL VOLUMEN POR FREIDORA DEL ACEITE
DE GIRASOL UTILIZADO EN 75 FRITURAS SUCESIVAS DE PATATAS

NUMERO DE FRITURA	NUMERO DE DETERMINACIONES	PERDIDA DE VOLUMEN DE ACEITE	
		ml/freidora	% pérdida
0-10	4	155,00 ± 30,40a	5,16a
11-20	6	191,66 ± 21,41a	6,38a
21-30	4	375,00 ± 28,90b	12,50b
31-40	4	375,00 ± 28,90b	12,50b
41-50	4	282,50 ± 21,82ab	9,42ab
51-60	4	287,50 ± 14,45ab	9,58ab
61-70	4	275,00 ± 16,68ab	9,17ab
71-75	2	250,00 ± 70,71ab	8,33ab

Los valores representan la media ± el error estándar del número de determinaciones.
Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$, según el análisis de varianza de muestras repetidas y el test Newman - Keuls para múltiples comparaciones).

TABLA 3- PESO DE LAS PATATAS FRITAS DESPUES DE CADA SERIE DE FRITURAS

NUMERO DE FRITURA	NUMERO DE DETERMINACIONES	GRAMOS DE PATATAS
0-10	20	194,75 ± 5,41a
11-20	20	204,50 ± 3,90a
21-30	20	194,75 ± 2,80a
31-40	20	187,50 ± 4,74a
41-50	20	210,00 ± 5,14a
51-60	20	200,50 ± 3,74a
61-70	20	198,70 ± 2,29a
71-75	10	195,00 ± 8,75a

Los valores representan la media ± el error estándar del número de determinaciones.
No se encontraron diferencias significativas entre frituras.

TABLA 4- EVOLUCION DEL INDICE DE REFRACCION DE UN ACEITE DE
GIRASOL UTILIZADO EN 75 FRITURAS SUCESIVAS DE PATATAS

NUMERO DE FRITURA	NUMERO DE DETERMINACIONES	INDICE DE REFRACCION A 20°C
CRUDO	3	$1,47286 \pm 3,55 \times 10^{-4}$
20	3	$1,47287 \pm 3,55 \times 10^{-4}$
30	3	$1,47297 \pm 1,99 \times 10^{-4}$
50	3	$1,47303 \pm 4,03 \times 10^{-4}$
75	3	$1,47403 \pm 3,55 \times 10^{-4}$

Los datos son la media \pm el error estándar de 3 determinaciones.
No se encontraron diferencias significativas entre las frituras.

TABLA 5 - EVOLUCION DEL INDICE DE COLOR DE UN ACEITE DE GIRASOL
UTILIZADO EN 75 FRITURAS SUCESIVAS DE PATATAS

NUMERO DE FRITURA	NUMERO DE DETERMINACIONES	INDICE DE COLOR
CRUDO	3	1,95 ± 0,07a
20	3	3,75 ± 0,04b
30	3	5,17 ± 0,31c
50	3	8,07 ± 0,53d
75	3	14,68 ± 0,60e

Indice de color calculado según la A.O.A.C.:

$$I. \text{ color} = 1,29 \times A_{460} + 6,97 \times A_{550} + 41,2 \times A_{620} - 56,4 \times A_{670}$$

Los datos representan la media ± el error estándar de 3 determinaciones.
Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$, según el análisis de varianza de muestras repetidas y el Test Newman - Keuls para múltiples comparaciones).

TABLA 6 - EVOLUCION DEL INDICE DE ACIDEZ DE UN ACEITE DE
GIRASOL UTILIZADO EN 75 FRITURAS SUCESIVAS DE PATATAS

NUMERO DE FRITURA	NUMERO DE DETERMINACIONES	INDICE DE ACIDEZ A 20º C
CRUDO	3	0,0480 ± 0,01a
20	3	0,2271 ± 0,03b
30	3	0,3033 ± 0,05c
50	3	0,3574 ± 0,01d
75	3	0,4639 ± 0,03e

Los datos son la media ± el error estándar de 3 determinaciones.
Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$, según el análisis de varianza de muestras repetidas y el Test Newman - Keuls para múltiples comparaciones).

TABLA 7 - VARIACION DE LA MEDIDA ESPECTROFOTOMETRICA DE LA ABSORCION
EN LA REGION ULTRAVIOLETA A 270 nm (K270) DE UN ACEITE
DE GIRASOL UTILIZADO EN 75 FRITURAS SUCEASIVAS

NUMERO DE FRITURA	NUMERO DE DETERMINACIONES	K 270 nm
CRUDO	3	944,63 ± 5,28a
20	3	1261,87 ± 10,27b
30	3	2739,46 ± 62,80c
50	3	3098,73 ± 40,49d
75	3	3251,05 ± 34,27e

Los datos son la media ± el error estándar de 3 determinaciones.
Los valores para la misma columna con letras distintas son significativa-
tivamente diferentes ($p < 0,05$, según el análisis de varianza de muestras
repetidas y el Test Newman - Keuls para múltiples comparaciones).

**TABLA 8 - EVOLUCION DEL CONTENIDO EN COMPUESTOS POLARES Y NO POLARES DE UN ACEITE
DE GIRASOL DURANTE LA REALIZACION DE 75 FRITURAS SUCEсивAS DE PATATAS**

NUMERO DE FRITURA	NUMERO DE DETERMINACIONES	COMPUESTOS NO POLARES	COMPUESTOS POLARES
CRUDO	2	94,91 ± 1,15a	4,10 ± 0,36a
10	2	91,25 ± 0,83b	10,73 ± 0,93b
20	2	84,48 ± 0,21c	15,52 ± 0,50c
30	2	82,00 ± 1,04d	17,05 ± 0,48c
40	2	81,36 ± 1,09d	17,06 ± 0,52c
50	2	80,97 ± 0,39d	18,62 ± 0,61c
65	2	80,57 ± 0,35d	18,70 ± 0,83c
75	2	80,24 ± 0,03d	18,57 ± 0,08c

Los valores representan la media ± el error estándar de 2 determinaciones.
 Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$, según el análisis de varianza de muestras repetidas y el Test Newman - Keuls para múltiples comparaciones).

**TABLA 9 - VARIACION DE LAS FRACCIONES DE TRIGLICERIDOS NO POLAR, POLAR,
RETENIDO Y ALTERACION TOTAL (POLAR + RETENIDO) DE UN ACEITE
DE GIRASOL PROCEDENTE DE 75 FRITURAS SUCESIVAS DE PATATAS**

Nº DE FRITURA	Nº DE DETER- MINACIONES	FRACCION NO POLAR	FRACCION POLAR	FRACCION RETENIDA EN COLUMNA	ALTERACION(A) TOTAL
CRUDO	2	94,91 ± 1,15 a	4,10 ± 0,36 a	1,01 ± 0,39a	5,09 ± 0,21 a
20	2	84,48 ± 0,21 b	15,52 ± 0,50 b	0,49 ± 0,71a	15,99 ± 0,40 b
30	2	82,00 ± 1,04 b	17,05 ± 0,48 b	0,96 ± 1,51a	17,99 ± 0,41 b
50	2	80,97 ± 0,39 b	18,62 ± 0,61 b	1,82 ± 0,22a	18,92 ± 0,49 b
75	2	80,24 ± 0,03 b	18,57 ± 0,08 b	2,28 ± 0,17a	19,11 ± 0,40 b

Los valores representan la media ± el error estándar de 2 determinaciones.

(A) Alteración total = Fracción polar + Fracción retenida

Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$, según el análisis de varianza de muestras repetidas y el test Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

TABLA 10 - VARIACION DE LAS FRACCIONES DE ESTERES METILICOS NO POLARES, POLARES, RETENIDA Y ALTERACION TOTAL (POLAR + RETENIDA) DE UN ACEITE DE GIRASOL UTILIZADO EN 75 FRITURAS SUCESIVAS DE PATATAS OBTENIDAS MEDIANTE COMATOLOGRAFIA EN COLUMNA.

Nº DE FRITURA	Nº DE DETERMINACIONES	FRACCION NO POLAR	FRACCION POLAR	FRACCION RETENIDA EN COLUMNA	ALTERACION(A) TOTAL
CRUDO	2	98,33 ± 0,01a	2,07 ± 0,07a	0,60 ± 0,07a	2,67 ± 0,02a
75	2	93,84 ± 0,02b	5,96 ± 0,01b	0,80 ± 0,01b	6,77 ± 0,01b

Los valores representan la media ± el error estándar de 2 determinaciones.

(A) Alteración total = Fracción polar + Fracción retenida

Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$, según el análisis de varianza de muestras repetidas y el test Newman- Keuls para múltiples comparaciones).

**TABLA 11- COMPOSICION PORCENTUAL DE LOS ACIDOS GRASOS MAYORITARIOS DE LAS DIETAS
EXPERIMENTALES. RELACIONES C16:1/ C16:0, C18:1/C18:0, C20:4/C18:2 E INDICE
DE SATURACION.**

	DIETA BASAL	DIETA CRUDO	DIETA FRITURA 75
C 16:0	13,20 ± 0,01a	6,76 ± 0,15b	5,95 ± 0,01c
C 16:1 n-7	1,17 ± 0,00a	0,05 ± 0,01b	0,03 ± 0,00c
C 18:0	2,55 ± 0,00a	3,79 ± 0,09b	4,18 ± 0,01c
C 18:1 n-9	25,66 ± 0,01a	32,43 ± 0,09b	44,85 ± 0,20c
C 18:2 n-6	52,18 ± 0,00a	55,52 ± 0,05b	43,20 ± 0,23c
C 18:3	3,13 ± 0,00a	--- ± ---	--- ± ---
C 22:1 n-9	0,33 ± 0,01a	0,79 ± 0,09b	0,86 ± 0,01b
Monoinsaturados	27,16 ± 0,01a	33,31 ± 0,05b	45,74 ± 0,18c
Saturados	15,75 ± 0,01a	10,54 ± 0,06b	10,13 ± 0,03c
Pufa n-6	52,18 ± 0,01a	55,52 ± 0,05b	43,20 ± 0,23c
C 16:1 / C 16:0	0,08 ± 0,01a	0,008 ± 0,00b	0,006 ± 0,00c
C 18:1 / C 18:0	10,06 ± 0,01a	8,57 ± 0,23b	10,73 ± 0,01c
INDICE DE SATURACION	5,24 ± 0,01a	8,35 ± 0,04b	8,70 ± 0,02c

Indice de saturación = Suma de ácidos grasos insaturados / Suma de ácidos grasos saturados.
 Los valores representan la media ± el error estándar de 2 determinaciones.
 Los valores con distintas letra en la misma fila indican diferencias significativas
 (p<0,05, según el análisis de varianza de muestras repetidas y el Test Newman- Keuls
 para múltiples comparaciones).

**TABLA 12 - EVOLUCIÓN DE LA COMPOSICION PORCENTUAL DE LOS ACIDOS GRASOS
MAYORITARIOS DE LA FRACCION NO POLAR OBTENIDA MEDIANTE CRO-
MATOGRAFIA EN COLUMNA DE UN ACEITE DE GIRASOL UTILIZADO EN 75
FRITURAS SUCESIVAS DE PATATAS**

NUMERO DE FRITURA	NUMERO DE DETERMINACIONES	ACIDO PALMITICO C 16: 0 (%)	ACIDO ESTEARICO C 18: 0 (%)	ACIDO OLEICO C 18: 1 (%)	ACIDO LINOLEICO C 18: 2 (%)	ACIDO EURIICO C 22:1 (%)
CRUDO	2	6,76 ± 0,15a	3,79 ± 0,09a	32,43 ± 0,09a	55,52 ± 0,05a	0,79 ± 0,09a
20	2	6,60 ± 0,33a	3,93 ± 0,24a	40,66 ± 2,17b	47,46 ± 1,16b	0,96 ± 0,21a
30	2	6,50 ± 0,02a	4,12 ± 0,07b	39,79 ± 0,28b	44,10 ± 0,02c	0,83 ± 0,04a
50	2	6,59 ± 0,13a	4,17 ± 0,10b	43,39 ± 0,38b	44,20 ± 0,23c	0,84 ± 0,03a
75	2	5,95 ± 0,01b	4,18 ± 0,01b	44,85 ± 0,20b	43,20 ± 0,23c	0,86 ± 0,01a

Los datos representan la media ± el error estándar de 2 determinaciones.

Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$, según el análisis de varianza de muestras repetidas y el Test Newman - Keuls para múltiples comparaciones).

TABLA 13 - EVOLUCION DE LA COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE UN ACEITE
DE GIRASOL UTILIZADO EN 75 FRITURAS SUCESIVAS DE PATATAS.

NUMERO DE FRITURA	Nº DE DETER- MINACIONES	C16:0 mg/100mg de aceite (1)	C18:0 mg/100mg de aceite (1)	C18:1 mg/100mg de aceite (1)	C18:2 mg/100mg de aceite (1)	C22:1 mg/100mg de aceite (1)
CRUDO	2	6,64 ± 0,14a	3,73 ± 0,09a	31,89 ± 0,09a	54,59 ± 0,05a	0,79 ± 0,07a
75	2	5,57 ± 0,00a	3,92 ± 0,01b	42,09 ± 0,18b	40,92 ± 0,32c	0,81 ± 0,00a

% ácido A x % de Esteres metílicos no polares
1)Calculado según Pérez Camino(1986)= -----
100

Los datos representan la media ± el error estándar de 2 determinaciones.
Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes (p<0,05,
según el análisis de varianza de muestras repetidas y el Test Newman- Keuls para múltiples comparaciones).

TABLA 14 - EVOLUCION DE LA COMPOSICION PORCENTUAL DE LOS COMPUESTOS
ESPECIFICOS DE LA ALTERACION DE UN ACEITE DE GIRASOL PROCEDENTE
DE 75 FRITURAS SUCESIVAS DE PATATAS

Nº DE FRITURA	Nº DE DETER- MINACIONES	ALTERACION TERMOXIDATIVA			ALTERACION HIDROLITICA	
		POLIMEROS DE TRIGLICERIOS (%)	DIMEROS DE TRIGLICERIOS (%)	TRIGLICERIDOS OXIDADOS (%)	DIGLICERIDOS (%)	ACIDOS GRASOS LIBRES(%)
CRUDO	2	1,9 ± 0,1 a	14,8 ± 0,5 a	52,9 ± 1,4 a	21,8 ± 1,0 a	8,4 ± 0,4 a
20	2	10,2 ± 0,3 b	39,2 ± 0,9 b	39,2 ± 0,7 b	8,3 ± 0,4 b	3,1 ± 0,2 b
30	2	13,9 ± 0,3 c	39,4 ± 0,8 b	36,1 ± 0,6 c	7,4 ± 0,3 b	3,3 ± 0,2 b
50	2	16,5 ± 0,4 d	39,1 ± 1,0 b	34,8 ± 0,7 cd	7,4 ± 0,2 b	2,3 ± 0,1 c
75	2	18,0 ± 0,4 e	39,3 ± 1,2 b	32,8 ± 0,6 d	7,4 ± 0,3 b	2,5 ± 0,1 c

Los valores representan la media ± el error estándar de 2 determinaciones.

Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$, según el análisis de varianza de muestras repetidas y el test Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

TABLA 15- DISTRIBUCION DEL CONTENIDO DE LOS COMPUESTOS DE ALTERACION TERMOXIDATIVA E HIDROLITICA DE UN ACEITE DE GIRASOL PROCEDENTE DE 75 FRITURAS SUCESIVAS DE PATATAS

	NUMERO DE FRITURAS				
	0	20	30	50	75
CONTENIDO POLAR TOTAL mg/100 mg aceite	5,09 ± 0,21a	15,99 ± 0,40b	17,99 ± 0,41c	18,92 ± 0,49d	19,11 ± 0,40d
ALTERACION TERMOXIDATIVA TOTAL mg/100 mg aceite	3,55 ± 0,14a	14,16 ± 0,40b	16,08 ± 0,41c	17,10 ± 0,50d	17,22 ± 0,49d
POLIMEROS DE TRIGLICERIDOS mg/100 mg aceite	0,10 ± 0,01a	1,65 ± 0,12b	2,50 ± 0,20c	3,15 ± 0,20d	3,44 ± 0,17e
DIMEROS DE TRIGLICERIDOS mg/100 mg aceite	0,75 ± 0,12a	6,25 ± 0,30b	7,09 ± 0,30c	7,37 ± 0,44c	7,51 ± 0,36c
TRIGLICERIDOS OXIDADOS	2,70 ± 0,41a	6,26 ± 0,30b	6,49 ± 0,27b	6,58 ± 0,39b	6,27 ± 0,30b
ALTERACION HIDROLITICA TOTAL mg/100 mg aceite	1,54 ± 0,12a	1,83 ± 0,07b	1,91 ± 0,09b	1,82 ± 0,10b	1,89 ± 0,07b
DIGLICERIDOS mg/100 mg aceite	1,11 ± 0,17a	1,33 ± 0,06b	1,32 ± 0,10b	1,39 ± 0,10b	1,41 ± 0,07b
ACIDOS GRASOS LIBRES mg/100 mg aceite	0,43 ± 0,08a	0,50 ± 0,07a	0,59 ± 0,08b	0,43 ± 0,07a	0,48 ± 0,06a

Los valores representan la media ± el error estándar de 2 determinaciones.

Los valores para la misma fila con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$, según el análisis de varianza de muestras repetidas y el Test Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

TABLA 16- EVALUACION DEL COCIENTE COMPUESTOS NO POLARES/ DISTINTOS COMPUESTOS DE ALTERACION HIDROLITICA Y TERMOXIDATIVA DE UN ACEITE DE GIRASOL UTILIZADO EN 75 FRITURAS SUCESIVAS DE PATATAS

	NUMERO DE FRITURAS				
	0	20	30	50	75
COMPUESTOS NO POLARES/ COMPUESTOS POLARES	18,6	5,3	4,6	4,3	4,2
COMPUESTOS NO POLARES/ COMPUESTOS DE ALTERACION TERMOXIDATIVA	26,4	5,9	5,1	4,7	4,7
COMPUESTOS NO POLARES/ COMPUESTOS DE ALTERACION HIDROLITICA	61,6	45,9	42,3	44,6	42,8
COMPUESTOS DE ALTERACION TERMOXIDATIVA/ COMPUESTOS DE ALTERACION HIDROLITICA	2,3	7,7	8,4	9,4	9,1

TABLA 17- CORRELACIONES DE PEARSON ENTRE DISTINTOS PARAMETROS ESTUDIADOS CON EL NUMERO DE FRITURAS

	Nº DE FRITURA
Indice de color	$r = 0,9704$ ($p < 0,01$)
Indice de acidez	$r = 0,9675$ ($p < 0,01$)
Indice de refracción	$r = 0,8452$ ($p < 0,01$)
Absorción en U.V. λ 270	$r = 0,8945$ ($p < 0,01$)
Compuestos polares	$r = 0,7999$ ($p < 0,05$)
Triglicéridos no polares	$r = -0,8307$ ($p < 0,01$)
Acido esteárico (%)	$r = 0,885$ ($p < 0,01$)
Acido oléico (%)	$r = 0,906$ ($p < 0,01$)
Acido linoléico (%)	$r = -0,831$ ($p < 0,01$)

r = coeficiente de correlación producto-momento de Pearson
 No se presentaron correlaciones no significativas

TABLA 18- CORRELACIONES DE PEARSON ENTRE LOS DISTINTOS PARAMETROS ESTUDIADOS

	Triglicéridos no alterados	Compuestos Polares	Indice de acidez	Indice de Color	Indice de Refracción	K 270
Triglicéridos no alterados	$r = 1,00$					
Compuestos polares	$r = -0,992$	$r = 1,00$				
Indice de acidez	$r = -0,9206$	$r = 0,9088$	$r = 1,00$			
Indice de color	$r = -0,905$	$r = -0,7853$	$r = 0,9079$	$r = 1,00$		
Indice de refracción	$r = -0,504NS$	$r = 0,449NS$	$r = 0,7915$	$r = 0,9363$	$r = 1,00$	$r = 0,60$
k 270	$r = -0,8604$	$r = 0,8135$	$r = 0,9183$	$r = 0,8139$	$r = 0,604$	$r = 1,00$
Acido esteárico (%)	$r = -0,936$	$r = 0,913$				
Acido oléico (%)	$r = -0,957$	$r = 0,955$				
Acido linoléico (%)	$r = -0,831$	$r = -0,984$				

$p > 0,05$ si $0,553 > r < 0,684$

$p > 0,01$ si $r > 0,684$

NS - Correlación no significativa.

TABLA 19- CORRELACIONES DE PEARSON ENTRE LOS DISTINTOS COMPUESTOS DE ALTERACION EN LOS ACEITES CON EL NUMERO DE FRITURAS

	Nº DE FRITURA
Compuestos polares	$r = 0,7954$ ($p < 0,01$)
Polímeros de triglicéridos	$r = 0,9324$ ($p < 0,01$)
Dímeros de triglicéridos	$r = 0,7710$ ($p < 0,01$)
Triglicéridos oxidados	$r = 0,6743$ ($p < 0,05$)
Alteración termoxidativa	$r = 0,7979$ ($p < 0,01$)
Diglicéridos	$r = 0,8649$ ($p < 0,01$)
Acidos grasos libres	$r = 0,0198$ NS
Alteración hidrolítica	$r = -0,6999$ ($p < 0,05$)

r = coeficiente de correlación producto- momento de Pearson.
 NS - Correlación no significativa

**TABLA 20 - CORRELACIONES DE PEARSON ENTRE LOS DISTINTOS COMPUESTOS
DE ALTERACION DE LOS ACEITES CON RESPECTO A LA ALTERACION
TOTAL (COMPUESTOS POLARES)**

	COMPUESTOS POLARES	
Polímeros de triglicéridos	r= 0,9452	(p< 0,01)
Dímeros de triglicéridos	r= 0,9992	(p< 0,01)
Triglicéridos oxidados	r= 0,9823	(p< 0,01)
Compuestos de alteración termoxidativa	r=1,0000	(p< 0,01)
Diglicéridos	r= 0,9777	(p< 0,01)
Acidos grasos libres	r=0,4106	NS
Compuestos de alteración hidrolítica	r=0,9615	(p< 0,01)

r= coeficiente de correlación producto-momento de Pearson.

NS - Correlación no significativa.

TABLA 21 - INGESTA TOTAL, PROTEICA, Y GRASA (en gramos s,s) EN LOS

DISTINTOS PERIODOS ESTUDIADOS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES

DIA	INGESTA TOTAL CRUDO	INGESTA GRASA CRUDO	INGESTA PROTEICA CRUDO
1 AL 3	31,87 ± 1,27a	4,65 ± 0,19a	4,41 ± 0,18a
3 AL 7	43,81 ± 1,72a	6,37 ± 0,25a	6,05 ± 0,24a
7 AL 10	36,06 ± 1,28a	5,24 ± 0,19a	4,98 ± 0,18a
10 AL 14	54,62 ± 2,50a	7,94 ± 0,35a	7,44 ± 1,00a
14 AL 17	38,61 ± 2,34a	5,62 ± 0,34a	5,34 ± 0,23a
17 AL 21	55,35 ± 2,33a	8,05 ± 0,34a	7,65 ± 0,23a
21 AL 25	50,03 ± 2,77a	7,27 ± 0,40a	6,91 ± 0,28a
25 AL 27	24,19 ± 1,29a	3,52 ± 0,02a	3,36 ± 0,13a
INGESTA TOTAL	328,74 ± 7,06a	47,80 ± 1,43a	45,43 ± 1,35a

DIA	INGESTA TOTAL FRITURA 75	INGESTA GRASA FRITURA 75	INGESTA PROTEICA FRITURA 75
1 AL 3	32,9 ± 0,13a	4,81 ± 0,20a	4,48 ± 0,19a
3 AL 7	44,85 ± 1,25a	6,56 ± 0,18a	6,11 ± 0,17a
7 AL 10	36,41 ± 1,20a	5,32 ± 0,18a	4,96 ± 0,16a
10 AL 14	57,6 ± 2,19a	8,45 ± 0,33a	7,85 ± 0,30a
14 AL 17	43,51 ± 1,59a	6,36 ± 0,23a	5,93 ± 0,22a
17 AL 21	51,63 ± 4,29a	7,55 ± 0,63a	7,03 ± 0,59a
21 AL 25	47,80 ± 2,27a	6,99 ± 0,33a	6,51 ± 0,31a
25 AL 27	22,65 ± 1,06a	3,49 ± 0,23a	3,09 ± 0,14a
INGESTA TOTAL	337,35 ± 7,06a	49,32 ± 1,03a	45,95 ± 0,96a

Los valores representan la media ± el error estándar de 10 ratas.

No se encontraron diferencias significativas entre los lotes estudiados.

**TABLA 22 - INCREMENTO DE PESO (en gramos por día) DURANTE LOS DISTINTOS
PERIODOS ESTUDIADOS EN LOS LOTES EXPERIMENTALES**

DIAS	LOTE CRUDO	LOTE FRITURA 75
0 AL 3	4,55 ± 0,35a	3,79 ± 0,26a
3 AL 7	3,47 ± 0,34a	3,59 ± 0,21a
7 AL 10	3,77 ± 0,31a	2,77 ± 0,60a
10 AL 14	4,85 ± 0,31a	3,86 ± 0,30a
14 AL 17	3,40 ± 0,3 a	2,57 ± 0,27b
17 AL 21	4,19 ± 0,27a	1,99 ± 1,32a
21 AL 25	2,89 ± 0,51a	2,35 ± 0,44a
25 AL 27	6,09 ± 0,51a	5,72 ± 0,86a

Los valores representan la media ± el error estándar de 10 ratas.

Los valores con distinta letra en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$, según el análisis de varianza de muestras repetidas y el Test Newman - Keuls para múltiples comparaciones).

TABLA 23 a- EVOLUCION DEL PESO (en gramos) DURANTE EL DESARROLLO DE LA EXPERIENCIA

DIAS	LOTE CRUDO	LOTE FRITURA 75
DIA 0	73,82 ± 2,15a	74,36 ± 1,08a
DIA 3	87,46 ± 2,88a	85,72 ± 1,12a
DIA 7	101,30 ± 3,44a	100,01 ± 1,47a
DIA 10	112,64 ± 3,73a	108,29 ± 2,79a
DIA 14	130,69 ± 4,86a	123,72 ± 3,56a
DIA 17	140,90 ± 5,63a	131,15 ± 3,65a
DIA 21	158,04 ± 6,45a	138,81 ± 5,86b
DIA 25	168,69 ± 7,33a	146,08 ± 6,41b
DIA 27	180,88 ± 7,70a	157,52 ± 6,07b
Incremento total	107,06 ± 2,10a	83,16 ± 1,96b

TABLA 23 b- EVOLUCION DEL PESO POR EL AYUNO (en gramos) TRAS 12 HORAS DE AYUNO.

DIAS	LOTE CRUDO	LOTE FRITURA 75
DIA 27	180,88 ± 7,70a	157,52 ± 6,07b
DIA 28	162,53 ± 8,01a	141,97 ± 6,31b
Pérdida de peso por ayuno	18,36 ± 1,90a	15,42 ± 1,56a

Los valores representan la media ± el error estándar de 10 ratas.

Los valores con distinta letra en la misma fila, indican diferencias significativas ($p < 0,05$, según el análisis de varianza de muestras repetidas y el Test Newman - Keuls para múltiples comparaciones).

TABLA 24- COEFICIENTE DE EFICACIA ALIMENTARIA (CEA) Y COEFICIENTE DE EFICACIA

PROTEICA (PER) EN LOS DISTINTOS PERIODOS ESTUDIADOS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES

DIAS	LOTE CRUDO CEA	LOTE FRITURA 75 CEA
0 AL 3	0,43 ± 0,03a	0,35 ± 0,03b
3 AL 7	0,28 ± 0,03a	0,33 ± 0,02a
7 AL 10	0,31 ± 0,02a	0,27 ± 0,03a
10 AL 14	0,33 ± 0,02a	0,27 ± 0,02b
14 AL 17	0,27 ± 0,02a	0,18 ± 0,15b
17 AL 21	0,30 ± 0,01a	0,23 ± 0,03a
21 AL 25	0,23 ± 0,02a	0,18 ± 0,02a
25 AL 27	0,51 ± 0,03a	0,53 ± 0,09a
TOTAL	0,33 ± 0,01a	0,25 ± 0,01b

DIAS	LOTE CRUDO PER	LOTE FRITURA 75 PER
0 AL 3	3,08 ± 0,08a	2,56 ± 0,09b
3 AL 7	2,30 ± 0,01a	2,36 ± 0,01a
7 AL 10	2,25 ± 0,06a	1,93 ± 0,08a
10 AL 14	2,41 ± 0,04a	1,97 ± 0,06b
14 AL 17	1,92 ± 0,05a	1,20 ± 0,10b
17 AL 21	2,18 ± 0,10a	1,67 ± 0,17a
21 AL 25	1,68 ± 0,10a	1,31 ± 0,13a
25 AL 27	3,65 ± 0,12a	3,42 ± 0,20a
TOTAL	2,35 ± 0,03a	1,81 ± 0,04b

CEA= Incremento de peso/ g ingeridos (ss)

PER= Incremento de peso/ g de proteína ingeridos (ss)

Los valores representan la media ± el error estándar de 10 determinaciones.

Los valores con distinta letra en la misma fila, indican diferencias significativas, ($p < 0,05$, según el análisis de varianza de muestras repetidas y el Test Newman - Keuls para múltiples comparaciones).

TABLA 25- PESO, COMPOSICION PORCENTUAL EN HUMEDAD, GRASA, PROTEINA, NITROGENO
(ss y sf) Y COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDAD APARENTE (CDA) DE GRASA Y PRO-
TEINA, EN LAS HECES DE LOS LOTES EXPERIMENTALES ESTUDIADOS.

	LOTE CRUDO	LOTE FRITURA 75
Peso g (sf)	7,10 ± 0,47a	7,55 ± 0,46a
Peso g (ss)	6,67 ± 0,47a	7,15 ± 0,46a
Grasa % (sf)	4,19 ± 0,34a	4,89 ± 0,34a
Grasa % (ss)	4,46 ± 0,37a	5,46 ± 0,33a
Humedad %	5,39 ± 0,32a	5,24 ± 0,27a
Proteína % (sf)	13,80 ± 0,66a	12,92 ± 0,59a
Proteína % (ss)	14,73 ± 0,71a	13,63 ± 0,62a
Nitrógeno % (sf)	2,10 ± 0,11a	2,07 ± 0,09a
Nitrógeno % (ss)	2,28 ± 0,09a	2,17 ± 0,10a
CDA grasa	0,94 ± 0,02a	0,95 ± 0,02a
CDA proteína	0,92 ± 0,02a	0,92 ± 0,02a

$$\text{CDA} = \frac{\text{g ingeridos} - \text{g eliminados}}{\text{g ingeridos}} = \frac{\text{g absorbidos}}{\text{g ingeridos}}$$

% Proteína = % N x 6,25

Los valores representan la media ± el error estándar de 10 determinaciones.

No se encontraron diferencias significativas entre los lotes estudiados.

TABLA 26- CONCENTRACION DE COLESTEROL Y FOSFOLIPIDOS EN HECES
(en mg totales y en mg/g de grasa) DE LOS LOTES EXPERIMENTALES
ESTUDIADOS

	LOTE CRUDO	LOTE FRITURA 75
COLESTEROL mg totales (s.s)	4,73 ± 0,27a	5,41 ± 0,41a
COLESTEROL mg totales (s.f)	4,44 ± 0,23a	5,12 ± 0,38a
COLESTEROL mg/g grasa	17,25 ± 0,70a	14,70 ± 0,50a
FOSFOLIPIDOS mg totales (s.s)	1,07 ± 0,15a	1,32 ± 0,11a
FOSFOLIPIDOS mg totales (s.f)	1,00 ± 0,14a	1,25 ± 0,10a
FOSFOLIPIDOS mg/g grasa	3,98 ± 0,74a	3,53 ± 0,95a
mg de grasa totales	311,35 ± 0,39a	388,00 ± 0,54b

Los valores representan la media ± el error estándar de 10 determinaciones.
 Los valores con distinta letra en la misma fila indican diferencias significativas
 ($p < 0,05$, según el análisis de varianzas de muestras repetidas y el test Newman-Keuls
 para múltiples comparaciones).

**TABLA 27- PESO, INDICE RELATIVO HEPATOSOMATICO Y COMPOSICION
PORCENTUAL EN HUMEDAD Y GRASA DE LOS HIGADOS EN LOS
LOTES EXPERIMENTALES**

	LOTE BASAL	LOTE CRUDO	LOTE FRITURA 75
Peso g (sf)	2,04 ± 0,07a	5,86 ± 0,42b	5,76 ± 0,37b
Peso g (ss)	0,55 ± 0,03a	1,63 ± 0,13b	1,64 ± 0,11b
Humedad %	73,02 ± 0,67a	72,28 ± 0,75a	71,51 ± 0,28b
Indice hepatosomático	3,19 ± 0,12a	3,59 ± 0,16b	4,04 ± 0,13c
Grasa % (sf)	3,47 ± 0,24a	3,98 ± 0,26a	4,18 ± 0,15b
Grasa % (ss)	12,81 ± 0,72a	13,61 ± 0,91a	14,29 ± 0,76b
Peso grasa hepática (sf)	0,07 ± 0,00a	0,23 ± 0,03b	0,24 ± 0,01b

Indice hepatosomático = $\text{Peso hígado (s.f.)} / \text{Peso corporal} \times 100$

Peso grasa hepática = $\text{Peso hígado(s.f.)} \times \% \text{grasa (s.f.)}$

Los valores representan la media ± el error estándar de 7 determinaciones para el lote basal y de 10 determinaciones para los lotes crudo y fritura 75 respectivamente. Los valores con distinta letra en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$, según el Test de Duncan).

**TABLA 31- CONCENTRACION SERICA DE COLESTEROL (TOTAL, LIBRE Y ESTERIFICADO),
FOSFOLIPIDOS Y TRIGLICERIDOS (en mg/dl y mmol/l) EN LOS LOTES EXPERIMENTALES**

	LOTE BASAL	LOTE CRUDO	LOTE FRITURA 75
COLESTEROL TOTAL			
mg/dl	87,20 ± 7,60a	67,04 ± 2,90b	83,22 ± 2,12a
mmol/l	2,26 ± 0,20a	1,73 ± 0,07b	2,15 ± 0,02a
COLESTEROL LIBRE			
mg/dl	14,01 ± 1,73a	8,05 ± 0,44b	12,65 ± 1,74a
mmol/l	0,36 ± 0,04a	0,21 ± 0,12b	0,33 ± 0,05a
COLESTEROL ESTERIFICADO			
mg/dl	72,33 ± 6,68a	58,99 ± 2,65b	70,56 ± 2,44a
mmol/l	1,87 ± 0,17a	1,53 ± 0,06b	1,82 ± 0,06a
FOSFOLIPIDOS			
mg/dl	108,47 ± 12,28a	110,12 ± 2,96a	112,37 ± 6,33a
mmol/l	1,40 ± 0,16a	1,42 ± 0,04a	1,45 ± 0,08a
TRIGLICERIDOS			
mg/dl	17,90 ± 1,75a	34,61 ± 1,57b	33,61 ± 1,44b
mmol/l	0,20 ± 0,02a	0,39 ± 0,18b	0,38 ± 0,02b

Los valores representan la media ± el error estándar de 7 determinaciones para el lote basal, y 10 determinaciones para los lotes crudo y fritura 75 respectivamente.

Los valores con distinta letra en la misma fila indica diferencias significativas (p<0,05, según el Test de Duncan).

TABLA 32- COCIENTES, COLESTEROL TOTAL (CT)/ FOSFOLIPIDOS (FL), COLESTEROL TOTAL (CT)/ TRIGLICERIDOS (TG) E INDICE DE ESTERIFICACION (COLESTEROL ESTERIFICADO (CE)/ COLESTEROL TOTAL (CT) x 100) OBTENIDOS DE LOS VALORES PLASMATICOS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES

	LOTE BASAL	LOTE CRUDO	LOTE FRITURA 75
CT/FL	0,74 ± 0,02a	0,61 ± 0,03b	0,76 ± 0,04a
CT/TG	4,55 ± 0,02a	1,98 ± 0,14b	2,50 ± 0,09c
CE/CT x 100	82,95 ± 1,78a	87,98 ± 0,57a	84,81 ± 2,00a

Los valores representan la media ± el error estándar de 7 determinaciones para el lote basal, y 10 determinaciones para los lotes crudo y fritura 75 respectivamente.
 Los valores con distinta letra en la misma fila indica diferencias significativas (p<0,05, según el Test de Duncan).

**TABLA 33 - CONCENTRACION LIPIDICA (mg/dl) EN LAS DIFERENTES LIPO-
PROTEINAS PLASMATICAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES**

	LOTE BASAL	LOTE CRUDO	LOTE FRITURA 75
<u>VLDL</u>			
COLESTEROL TOTAL	2,68 ± 0,41a	1,09 ± 0,08b	1,31 ± 0,17b
COLESTEROL LIBRE	0,06 ± 0,05a	0,44 ± 0,15b	0,47 ± 0,13b
COLESTEROL ESTERIFICADO	2,62 ± 0,38a	0,75 ± 0,16b	0,81 ± 0,15b
FOSFOLIPIDOS	1,41 ± 0,09a	2,72 ± 0,70a	1,79 ± 0,43a
TRIGLICERIDOS	4,56 ± 0,48a	11,39 ± 1,81b	11,48 ± 1,61b
<u>LDL</u>			
COLESTEROL TOTAL	13,82 ± 1,85a	5,82 ± 0,74b	8,91 ± 0,36b
COLESTEROL LIBRE	4,04 ± 0,49a	2,09 ± 0,31b	3,04 ± 0,49b
COLESTEROL ESTERIFICADO	9,78 ± 1,50a	3,81 ± 0,72b	6,28 ± 1,10b
FOSFOLIPIDOS	8,79 ± 0,92a	3,25 ± 0,54b	3,47 ± 0,53b
TRIGLICERIDOS	5,35 ± 0,61a	5,62 ± 0,63a	4,96 ± 0,65a
<u>HDL</u>			
COLESTEROL TOTAL	67,58 ± 5,18a	53,39 ± 2,91b	68,73 ± 4,35a
COLESTEROL LIBRE	11,73 ± 1,17a	7,24 ± 0,91b	7,87 ± 1,08b
COLESTEROL ESTERIFICADO	55,85 ± 4,45ab	46,15 ± 3,32b	60,86 ± 4,49a
FOSFOLIPIDOS	91,87 ± 7,14a	95,04 ± 4,77a	111,02 ± 4,70b
TRIGLICERIDOS	7,49 ± 0,50a	10,98 ± 1,13b	12,26 ± 1,36b

Los valores representan la media ± el error estándar de 7 determinaciones para el lote basal y 9 para los lotes crudo y fritura 75 respectivamente.

Los valores con distinta letra en la misma fila indica diferencias significativas (p<0,05, según el Test de Duncan).

TABLA 34 - CONCENTRACION LIPIDICA (mm/l) EN LAS DIFERENTES LIPO--
PROTEINAS PLASMATICAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES

	LOTE BASAL	LOTE CRUDO	LOTE FRITURA 75
<u>VLDL</u>			
COLESTEROL TOTAL	0,07 ± 0,01a	0,03 ± 0,00b	0,03 ± 0,00b
COLESTEROL LIBRE	0,00 ± 0,00a	0,01 ± 0,00b	0,01 ± 0,00b
COLESTEROL ESTERIFICADO	0,07 ± 0,01a	0,02 ± 0,00b	0,02 ± 0,00b
FOSFOLIPIDOS	0,02 ± 0,00a	0,04 ± 0,01a	0,02 ± 0,00a
TRIGLICERIDOS	0,05 ± 0,00a	0,13 ± 0,02b	0,13 ± 0,02b
<u>LDL</u>			
COLESTEROL TOTAL	0,36 ± 0,05a	0,15 ± 0,02b	0,23 ± 0,03b
COLESTEROL LIBRE	0,10 ± 0,01a	0,05 ± 0,00b	0,08 ± 0,01b
COLESTEROL ESTERIFICADO	0,25 ± 0,04a	0,1 ± 0,02b	0,16 ± 0,03b
FOSFOLIPIDOS	0,11 ± 0,01a	0,04 ± 0,01b	0,04 ± 0,00b
TRIGLICERIDOS	0,06 ± 0,01a	0,06 ± 0,00a	0,05 ± 0,00a
<u>HDL</u>			
COLESTEROL TOTAL	1,75 ± 0,13a	1,38 ± 0,07b	1,70 ± 0,12a
COLESTEROL LIBRE	0,30 ± 0,03a	0,19 ± 0,02b	0,20 ± 0,03b
COLESTEROL ESTERIFICADO	1,45 ± 0,12ab	1,09 ± 0,13b	1,57 ± 0,12a
FOSFOLIPIDOS	1,19 ± 0,09a	1,22 ± 0,06a	1,43 ± 0,06b
TRIGLICERIDOS	0,08 ± 0,01a	0,13 ± 0,01b	0,14 ± 0,02b

Los valores representan la media ± el error estándar de 7 determinaciones para el lote basal y 9 determinaciones para los lotes crudo y fritura 75 respectivamente. Los valores con distinta letra en la misma fila indica diferencias significativas ($p < 0,05$, según el Test de Duncan).

**TABLA 35 - COMPOSICION LIPIDICA (%) DE LAS DIFERENTES LIPO-
PROTEINAS PLASMATICAS EN LOS LOTES EXPERIMENTALES**

	LOTE BASAL	LOTE CRUDO	LOTE FRITURA 75
<u>VLDL</u>			
COLESTEROL LIBRE	0,62 ± 0,42a	2,29 ± 0,58b	3,82 ± 0,91b
COLESTEROL ESTERIFICADO	29,87 ± 3,01a	5,08 ± 0,49b	5,00 ± 0,61b
FOSFOLIPIDOS	16,73 ± 1,22a	15,61 ± 0,89a	14,41 ± 1,48a
TRIGLICERIDOS	52,79 ± 3,62a	77,17 ± 2,51b	76,82 ± 3,42b
<u>LDL</u>			
COLESTEROL LIBRE	14,83 ± 1,74a	15,59 ± 1,43a	17,14 ± 2,35a
COLESTEROL ESTERIFICADO	34,04 ± 1,90a	24,80 ± 3,82b	33,90 ± 1,87a
FOSFOLIPIDOS	31,80 ± 1,12a	23,41 ± 2,98b	18,96 ± 1,93b
TRIGLICERIDOS	19,33 ± 1,24a	36,84 ± 3,71b	30,18 ± 3,33b
<u>HDL</u>			
COLESTEROL LIBRE	7,04 ± 0,51a	4,96 ± 0,33b	4,11 ± 0,49b
COLESTEROL ESTERIFICADO	33,42 ± 0,75a	28,07 ± 1,27a	31,54 ± 1,52a
FOSFOLIPIDOS	55,03 ± 0,55a	60,02 ± 0,93a	58,01 ± 1,23a
TRIGLICERIDOS	4,51 ± 0,17a	6,95 ± 0,44b	6,36 ± 0,52b

Los valores representan la media ± el error estándar de 7 determinaciones para el lote basal y 9 determinaciones para los lotes crudo y fritura 75 respectivamente. Los valores con distinta letra en la misma fila indica diferencias significativas (p<0,05, según el Test de Duncan).

**TABLA 36 - DISTRIBUCION (%) DE LOS LIPIDOS SERICOS EN LAS DIFERENTES
LIPOPROTEINAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES**

	LOTE BASAL	LOTE CRUDO	LOTE FRITURA 75
COLESTEROL TOTAL			
VLDL	3,09 ± 0,29a	1,86 ± 0,12a	2,46 ± 0,24a
LDL	15,99 ± 0,97a	9,81 ± 1,37b	11,22 ± 1,02b
HDL	80,29 ± 1,02a	88,31 ± 1,35b	87,29 ± 1,04b
COLESTEROL LIBRE			
VLDL	0,31 ± 0,22a	0,80 ± 0,32b	0,74 ± 0,20b
LDL	25,31 ± 0,82a	7,70 ± 1,79b	7,51 ± 0,52b
HDL	74,39 ± 0,96a	91,34 ± 1,89b	91,64 ± 0,66b
COLESTEROL ESTERIFICADO			
VLDL	3,75 ± 0,35a	6,01 ± 1,22b	6,72 ± 1,03b
LDL	13,80 ± 1,14a	20,86 ± 1,23b	24,72 ± 1,83b
HDL	81,67 ± 1,11a	71,64 ± 2,93b	69,09 ± 0,90b
FOSFOLIPIDOS			
VLDL	1,41 ± 0,09a	2,73 ± 0,65a	1,47 ± 0,31a
LDL	8,58 ± 0,50a	3,16 ± 0,45b	2,97 ± 0,38b
HDL	90,02 ± 0,47a	94,11 ± 0,82b	95,54 ± 0,40b
TRIGLICERIDOS			
VLDL	25,99 ± 3,35a	39,58 ± 2,08b	37,65 ± 5,24ab
LDL	29,60 ± 2,46a	20,01 ± 0,79b	18,26 ± 3,30b
HDL	41,77 ± 1,27a	40,42 ± 1,89a	42,34 ± 3,14a

Los valores representan la media ± el error estándar de 7 determinaciones para el lote basal y 9 determinaciones para el lote crudo y fritura 75 respectivamente. Los valores con distinta letra en la misma fila, indican diferencias significativas (p<0,05, según el Test de Duncan).

TABLA 37 - RENDIMIENTO TOTAL DE LA SEPARACION LIPOPROTEICA POR ULTRACEN-
TRIFUGACION

	LOTE BASAL	LOTE CRUDO	LOTE FRITURA 75
COLESTEROL (mg/dl)			
VLDL	2,68 ± 0,41a	1,09 ± 0,08b	1,31 ± 0,17b
LDL	13,82 ± 1,83a	5,82 ± 0,74b	8,91 ± 0,36b
HDL	67,58 ± 5,18a	53,39 ± 2,91b	68,73 ± 4,35a
TOTAL	84,08 ± 8,01a	60,30 ± 2,75a	78,77 ± 4,99a
SUERO	87,20 ± 7,60a	67,04 ± 2,90b	83,22 ± 2,12a
RECUPERACION (%)	96,08 ± 0,69a	90,43 ± 3,75b	95,30 ± 6,89b
FOSFOLIPIDOS (mg/dl)			
VLDL	1,41 ± 1,85a	2,72 ± 0,70a	1,79 ± 0,43a
LDL	8,79 ± 0,92a	3,25 ± 0,54b	3,47 ± 0,53b
HDL	91,87 ± 7,14a	95,04 ± 4,77a	111,02 ± 4,70b
TOTAL	102,07 ± 8,74a	101,01 ± 4,82a	116,20 ± 5,20a
SUERO	108,47 ± 12,28a	110,12 ± 2,96a	112,37 ± 6,33a
RECUPERACION (%)	86,25 ± 1,80a	92,38 ± 5,52b	104,66 ± 4,57b
TRIGLICERIDOS (mg/dl)			
VLDL	4,56 ± 0,48a	11,39 ± 1,81b	11,48 ± 1,61b
LDL	5,35 ± 0,61a	5,62 ± 0,63a	4,96 ± 0,65a
HDL	7,49 ± 0,50a	10,98 ± 1,13b	12,26 ± 1,36b
TOTAL	17,39 ± 0,94a	27,30 ± 2,26a	28,72 ± 1,80a
SUERO	17,90 ± 1,75a	34,61 ± 1,57b	33,61 ± 1,44b
RECUPERACION (%)	96,53 ± 10,25a	82,48 ± 5,80b	86,03 ± 5,12b

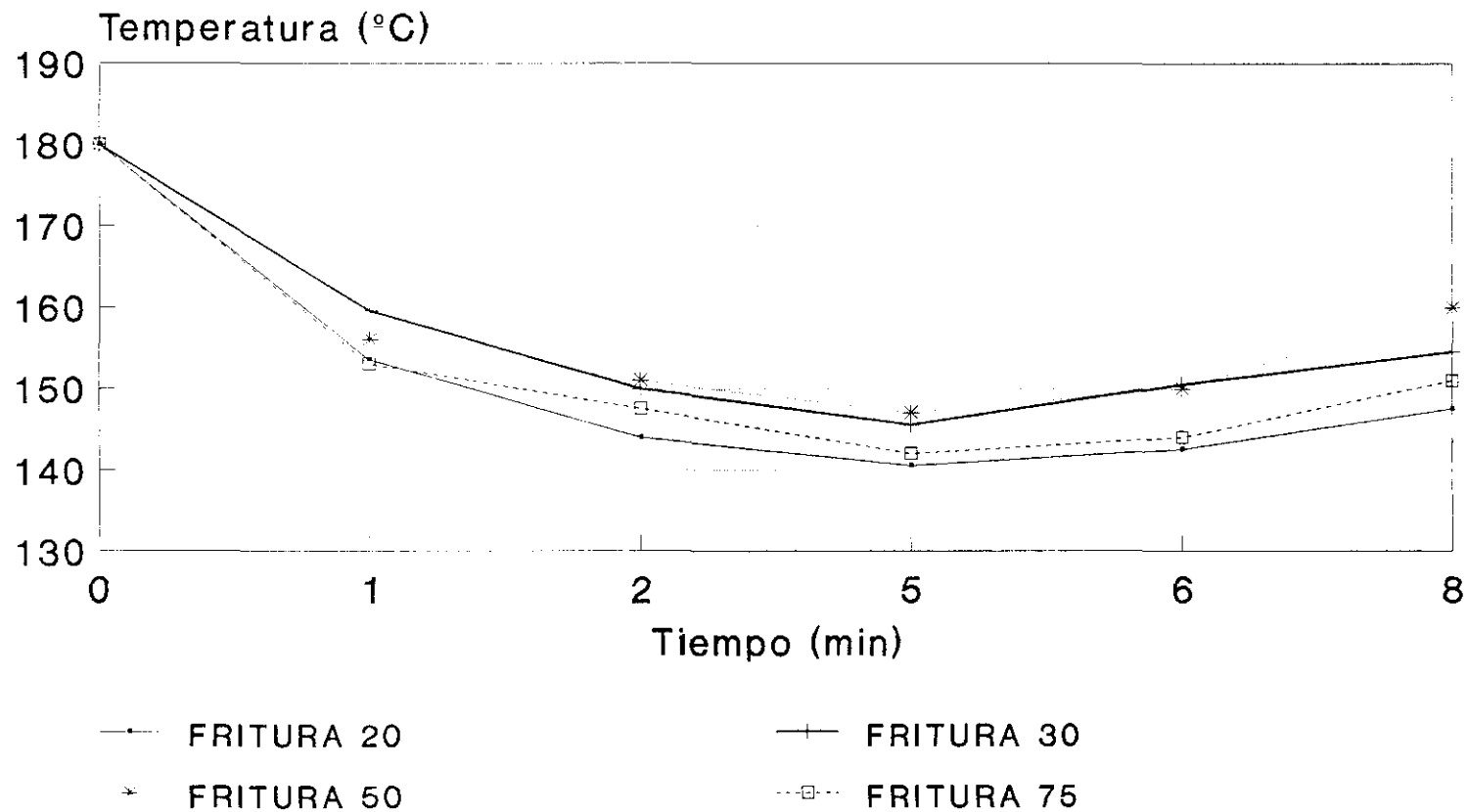
Los valores representan la media ± el error estándar de 7 determinaciones para el lote basal y 9 determinaciones para el lote crudo y fritura 75 respectivamente. Los valores con distinta letra en la misma fila, indican diferencias significativas ($p < 0,05$, según el Test de Duncan).

TABLA 38 - COCIENTE COLESTEROL TOTAL (CT)/ FOSFOLIPIDOS, COLESTEROL TOTAL/ TRIGLICERIDOS (TG) COLESTEROL LIBRE (CL) + FOSFOLIPIDOS/ COLESTEROL ESTERIFICADO (CE) + TRIGLICERIDOS Y COLESTEROL ESTERIFICADO/ COLESTEROL TOTAL x 100 OBTENIDOS DE LAS DIFERENTES LIPO-PROTEINAS EN LOS LOTES EXPERIMENTALES

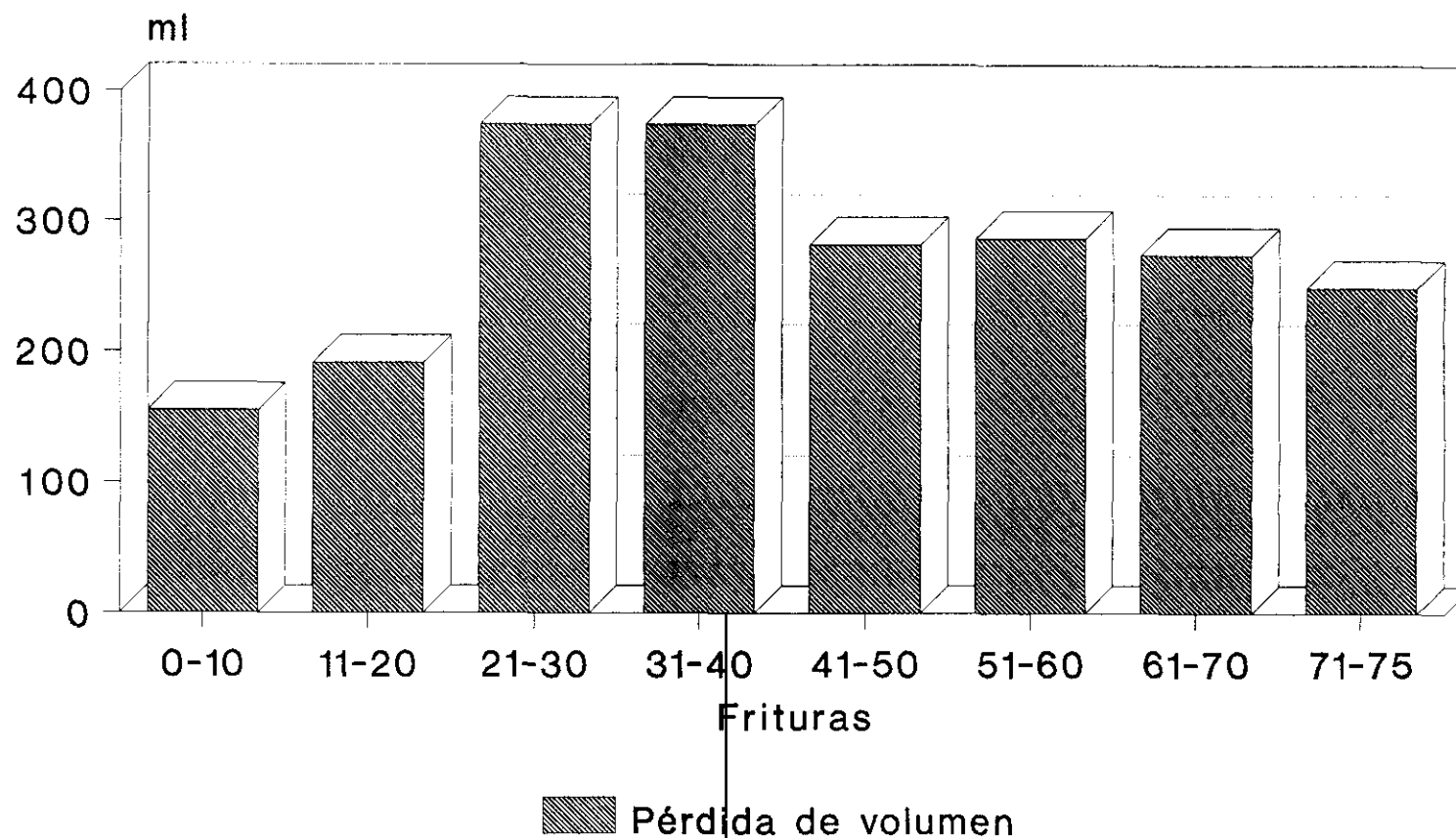
	LOTE BASAL	LOTE CRUDO	LOTE FRITURA 75
<u>VLDL</u>			
CT/FL	1,87 ± 0,26a	0,63 ± 0,13b	0,71 ± 0,14b
CT/TG	0,52 ± 0,38a	0,11 ± 0,02b	0,12 ± 0,02b
CL+FL/CE+TG	0,21 ± 0,02a	0,25 ± 0,06b	0,20 ± 0,02a
CE/CT x 100	98,35 ± 1,12a	77,05 ± 8,86b	63,84 ± 8,37b
<u>LDL</u>			
CT/FL	1,55 ± 0,09a	2,08 ± 0,29b	2,83 ± 0,32b
CT/TG	2,50 ± 0,04a	1,10 ± 0,17b	1,77 ± 0,23b
CL+FL/CE+TG	0,89 ± 0,08a	0,60 ± 0,07b	0,53 ± 0,07b
CE/CT x 100	69,74 ± 3,11a	66,69 ± 5,73a	65,94 ± 4,86a
<u>HDL</u>			
CT/FL	0,74 ± 0,02a	0,57 ± 0,03b	0,62 ± 0,04b
CT/TG	9,09 ± 0,00a	4,92 ± 0,38b	5,99 ± 0,57b
CL+FL/CE+TG	1,64 ± 0,06a	1,88 ± 0,09a	1,68 ± 0,11a
CE/CT x 100	82,59 ± 1,26a	85,98 ± 1,84a	97,71 ± 4,61b

Los valores representan la media ± el error estándar de 7 determinaciones en el lote basal y 9 determinaciones en los lotes crudo y fritura 75 respectivamente. Los valores con distinta letra en la misma fila indica diferencias significativas (p<0,05, según el Test de Duncan).

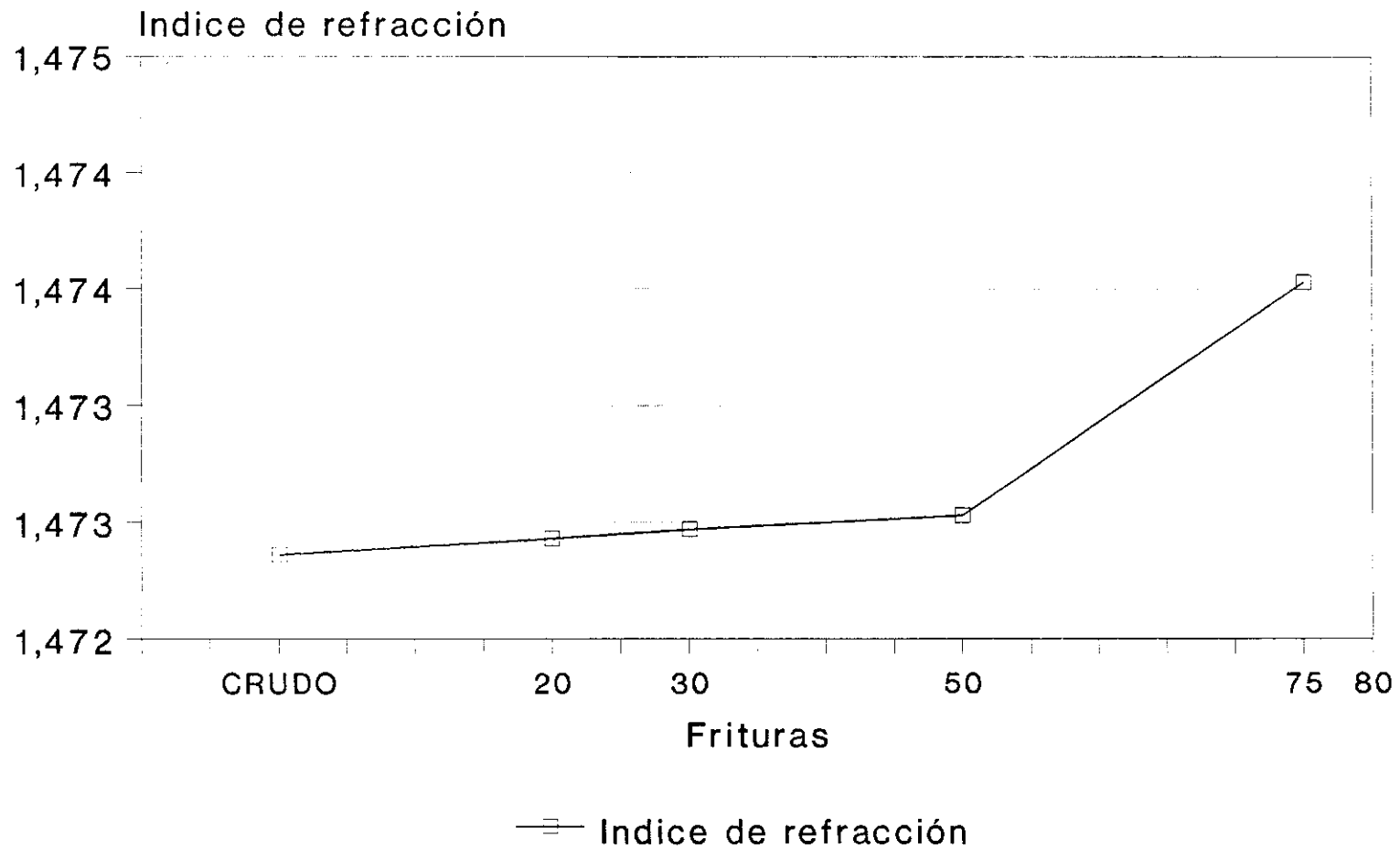
GRAFICA 1.EVOLUCION DE LA TEMPERATURA DEL ACEITE DE GIRASOL DEL BAÑO DE FRITURA DURANTE 75 FRITURAS SUCESIVAS.



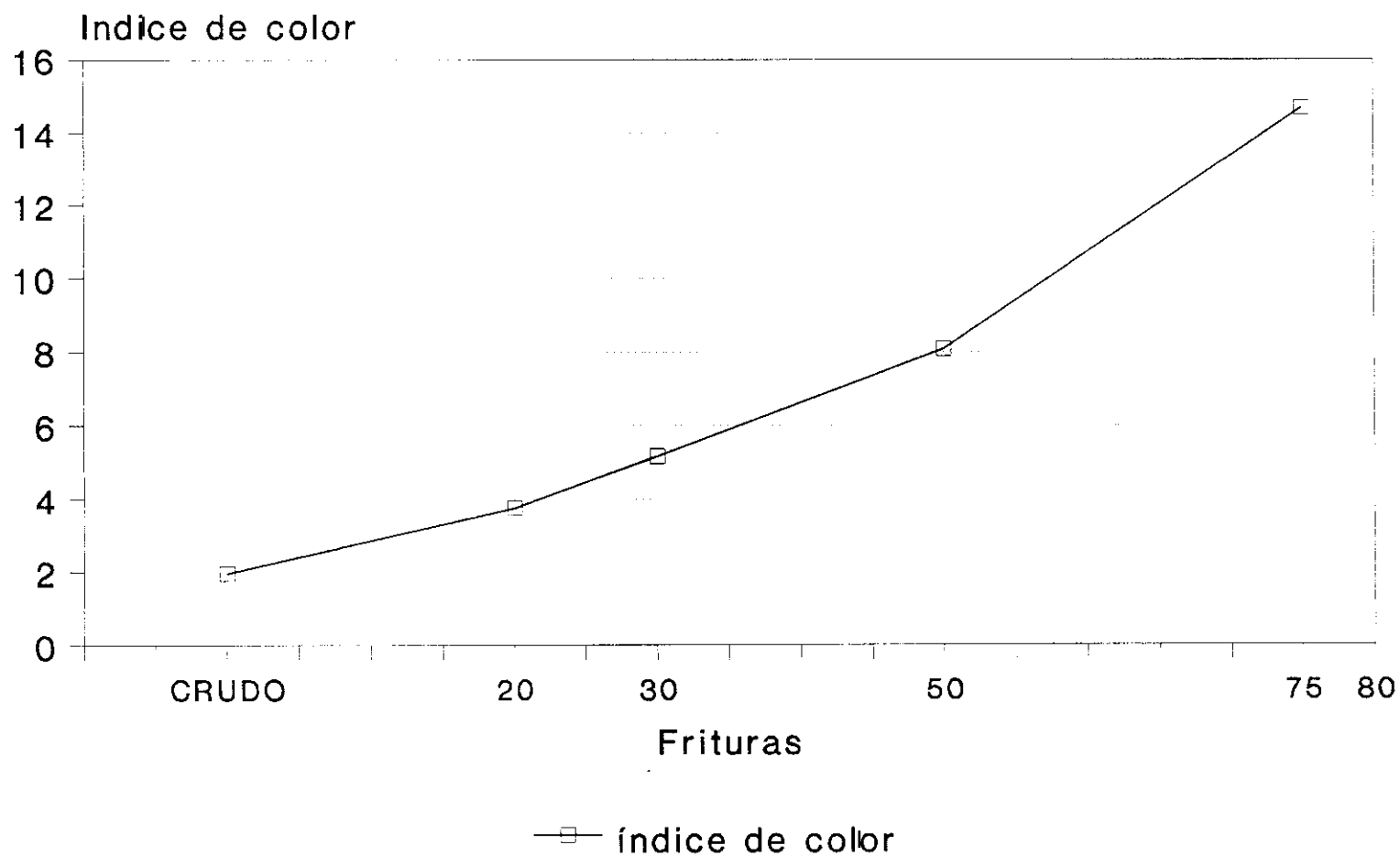
GRAFICA 2. PERDIDA DE VOLUMEN POR FREIDORA DEL ACEITE DE GIRASOL UTILIZADO EN 75 FRITURAS SUCESIVAS DE PATATAS.



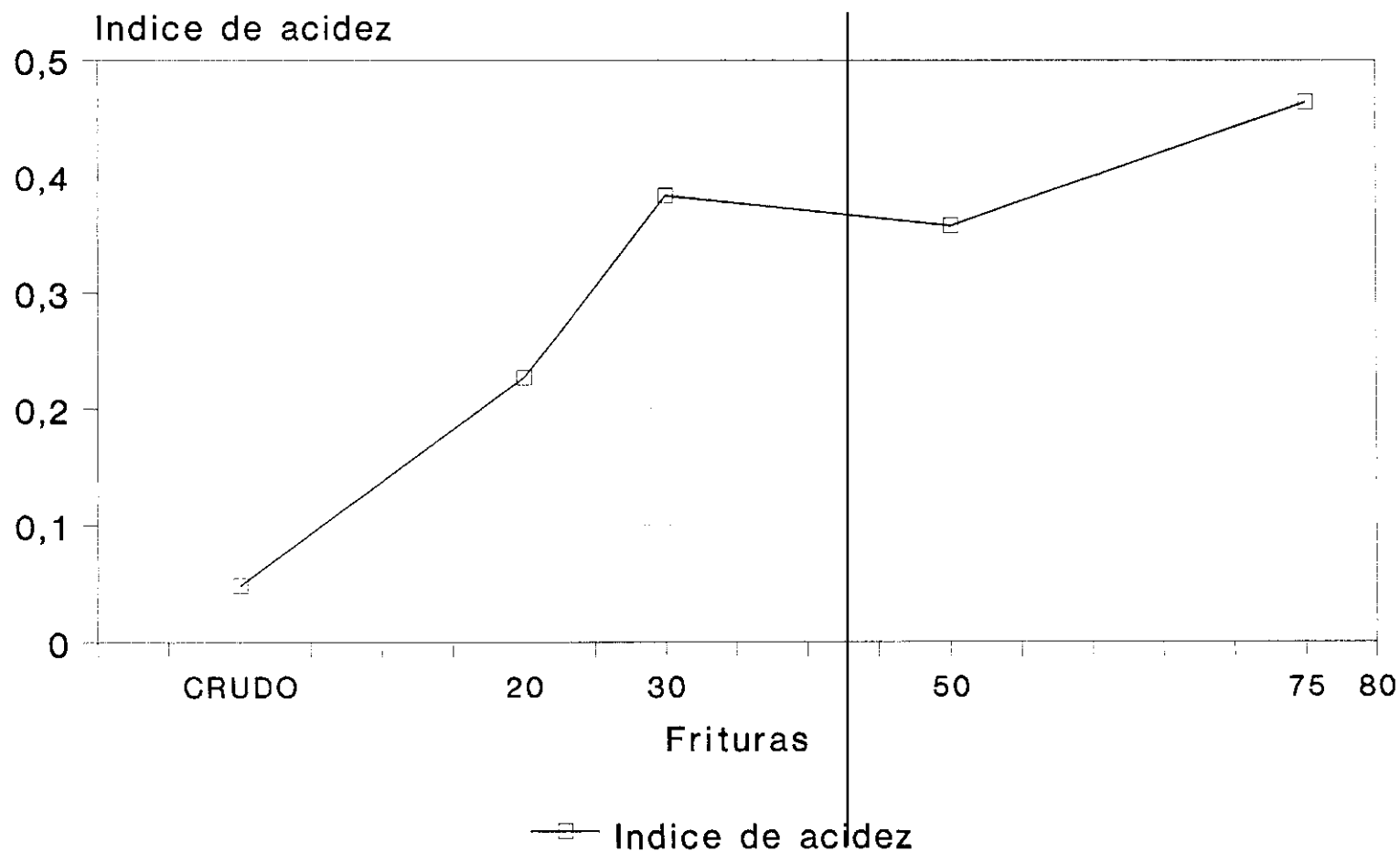
GRAFICA 3.EVOLUCION DEL INDICE DE REFRACCION CON EL NUMERO DE FRITURAS.



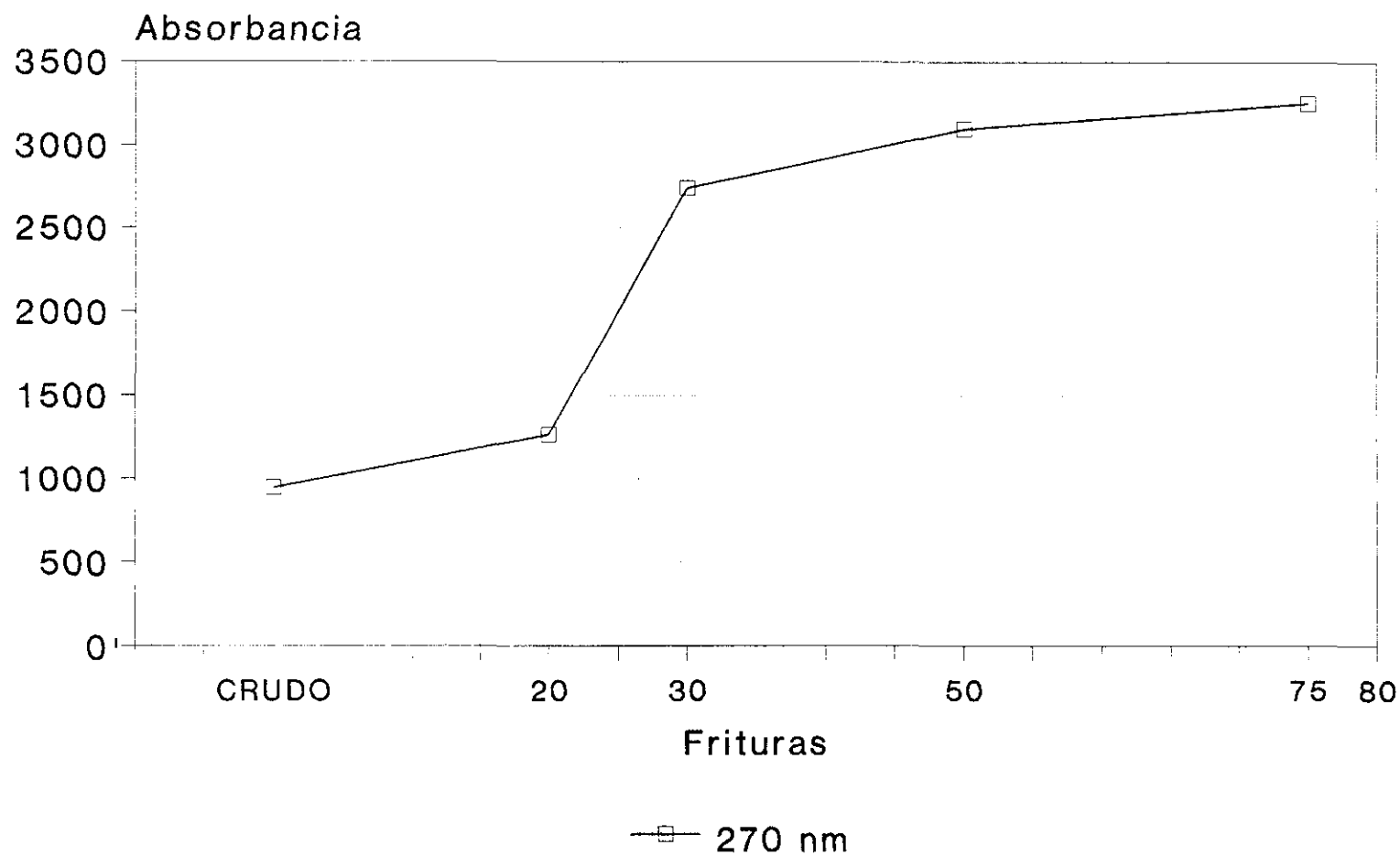
GRAFICA 4.EVOLUCION DEL INDICE DE COLOR CON EL NUMERO DE FRITURAS.



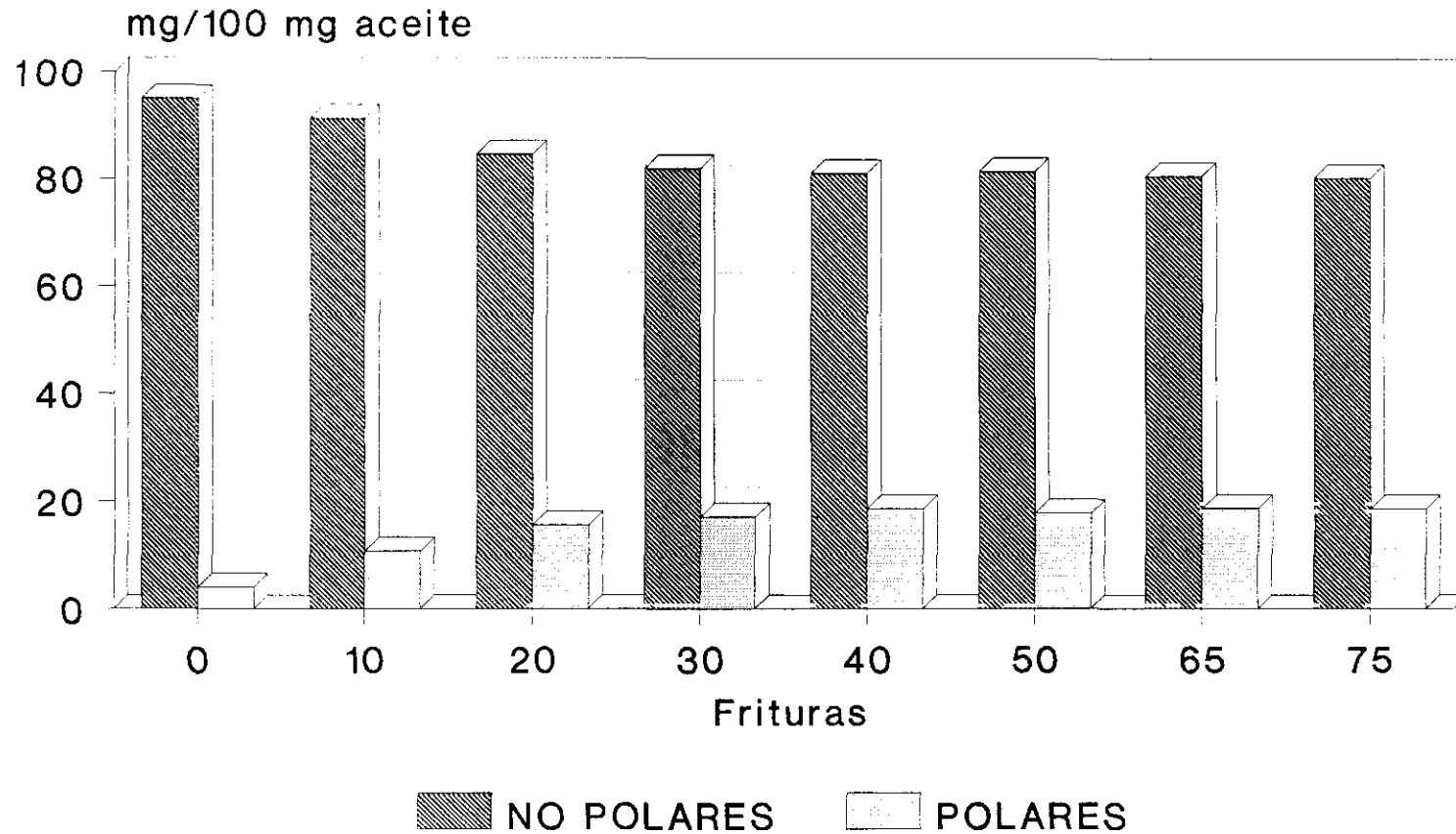
GRAFICA 5.EVOLUCION DE LA ACIDEZ LIBRE CON EL NUMERO DE FRITURAS.



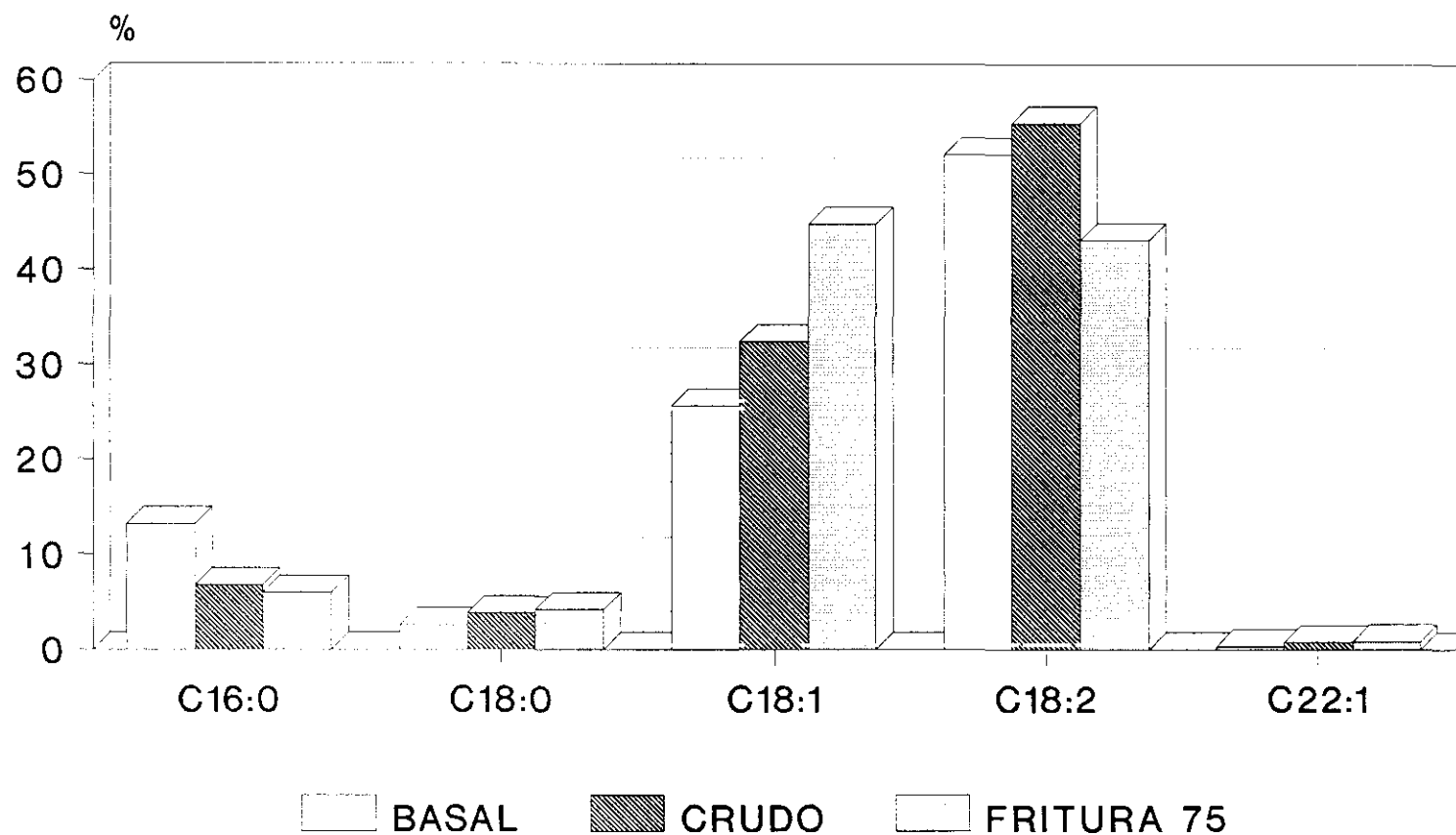
GRAFICA 6.EVOLUCION DE LA ABSORBANCIA A 270 nm CON EL NUMERO DE FRITURAS.



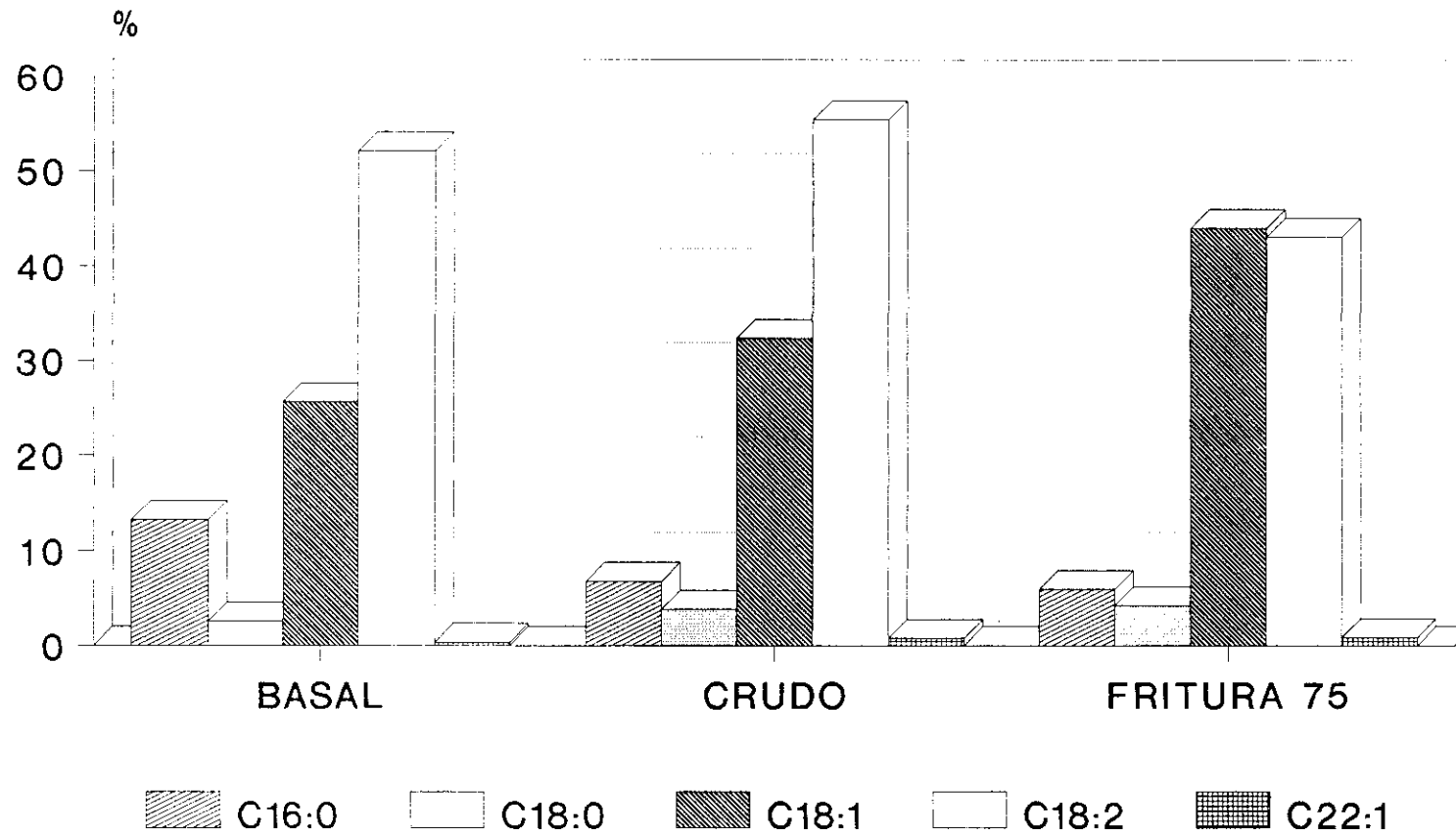
GRAFICA 7.EFECTO DEL NUMERO DE FRITURAS SOBRE LOS COMPUESTOS NO POLARES Y POLARES DEL ACEITE DE GIRASOL.



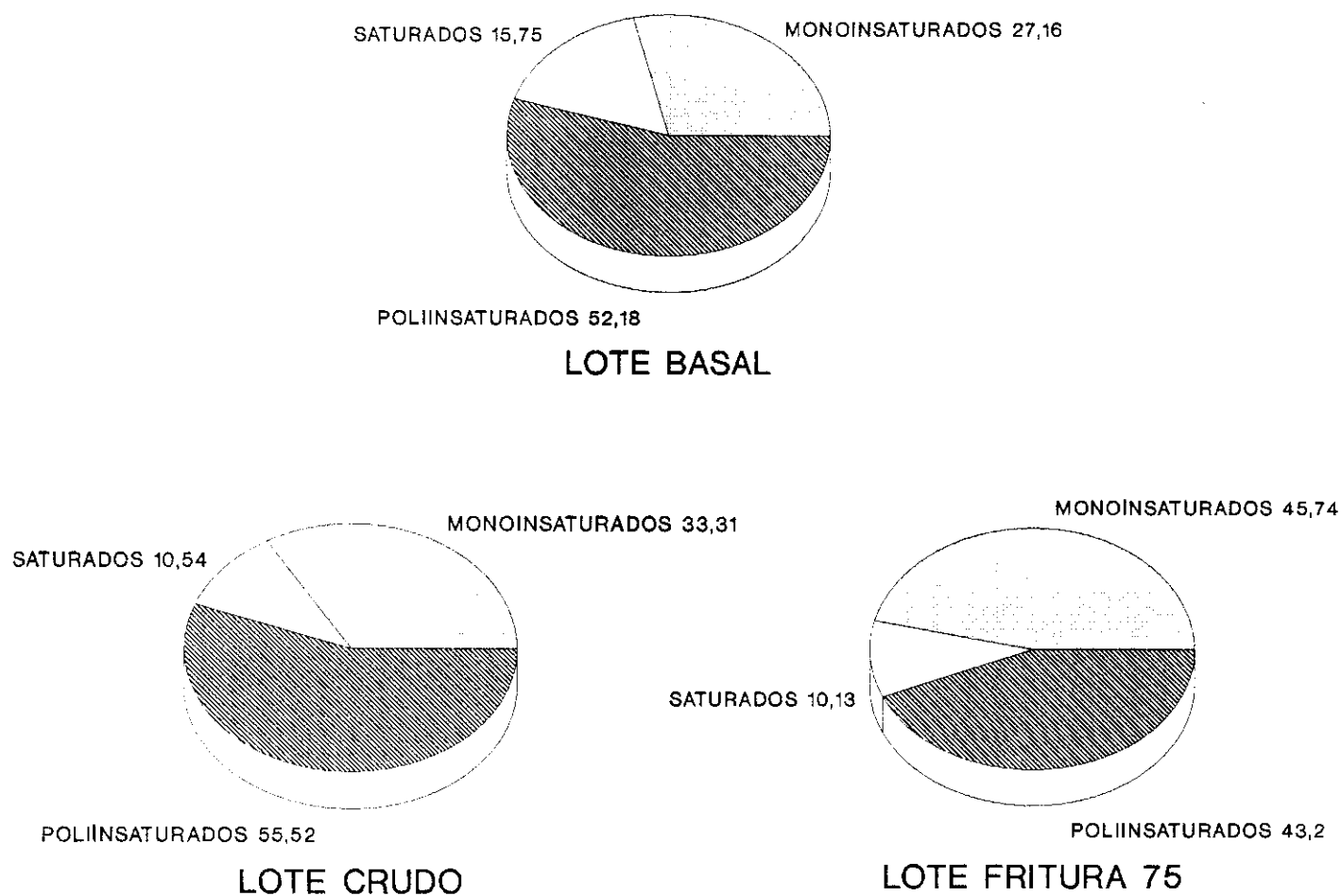
GRAFICA 8.COMPOSICION PORCENTUAL DE LOS ACIDOS GRASOS MAYORITARIOS DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES.



GRAFICA 9.COMPOSICION PORCENTUAL DE LOS ACIDOS GRASOS MAYORITARIOS DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES.

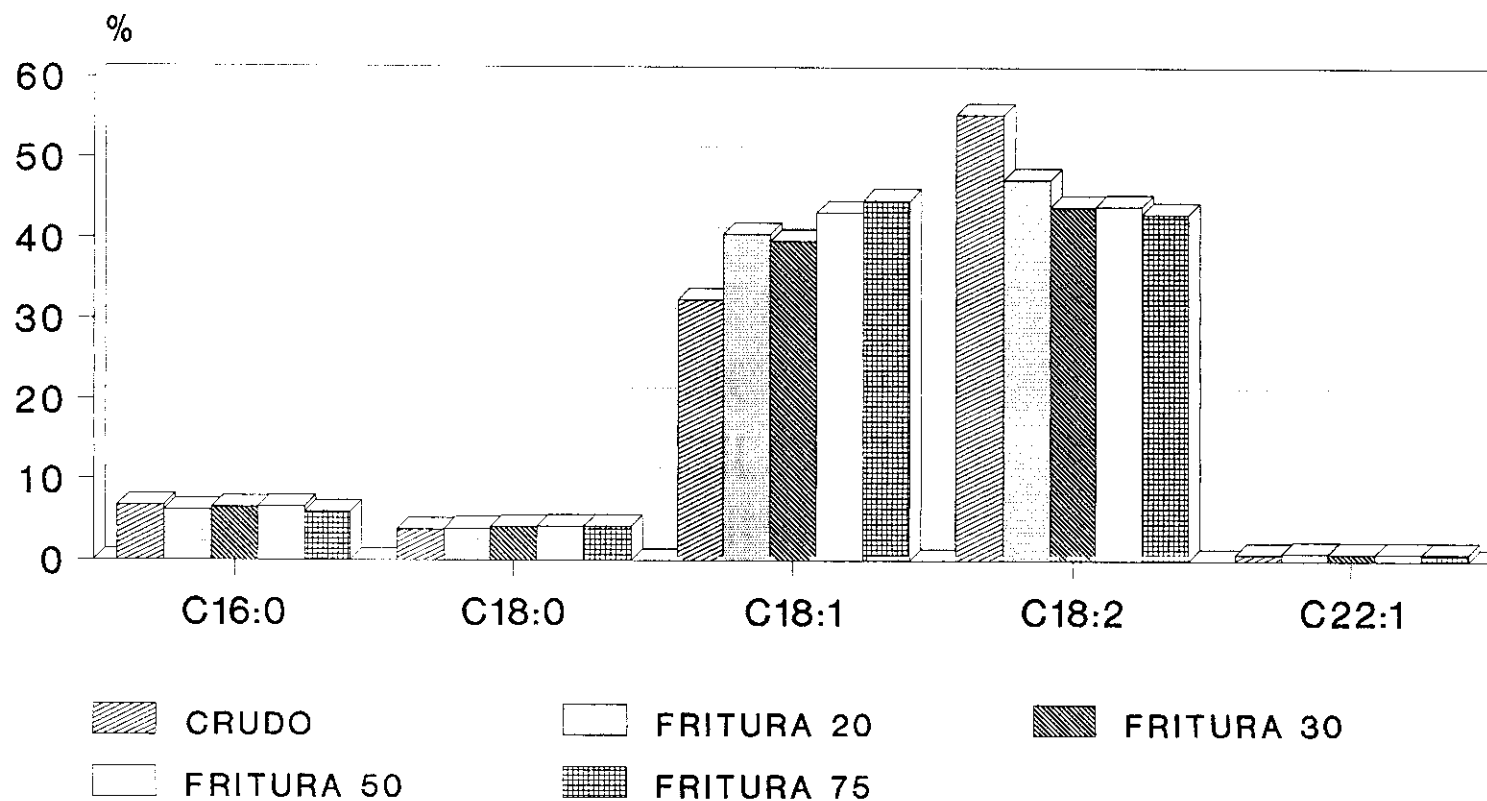


GRAFICA 10.TIPOS DE ACIDOS GRASOS DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES

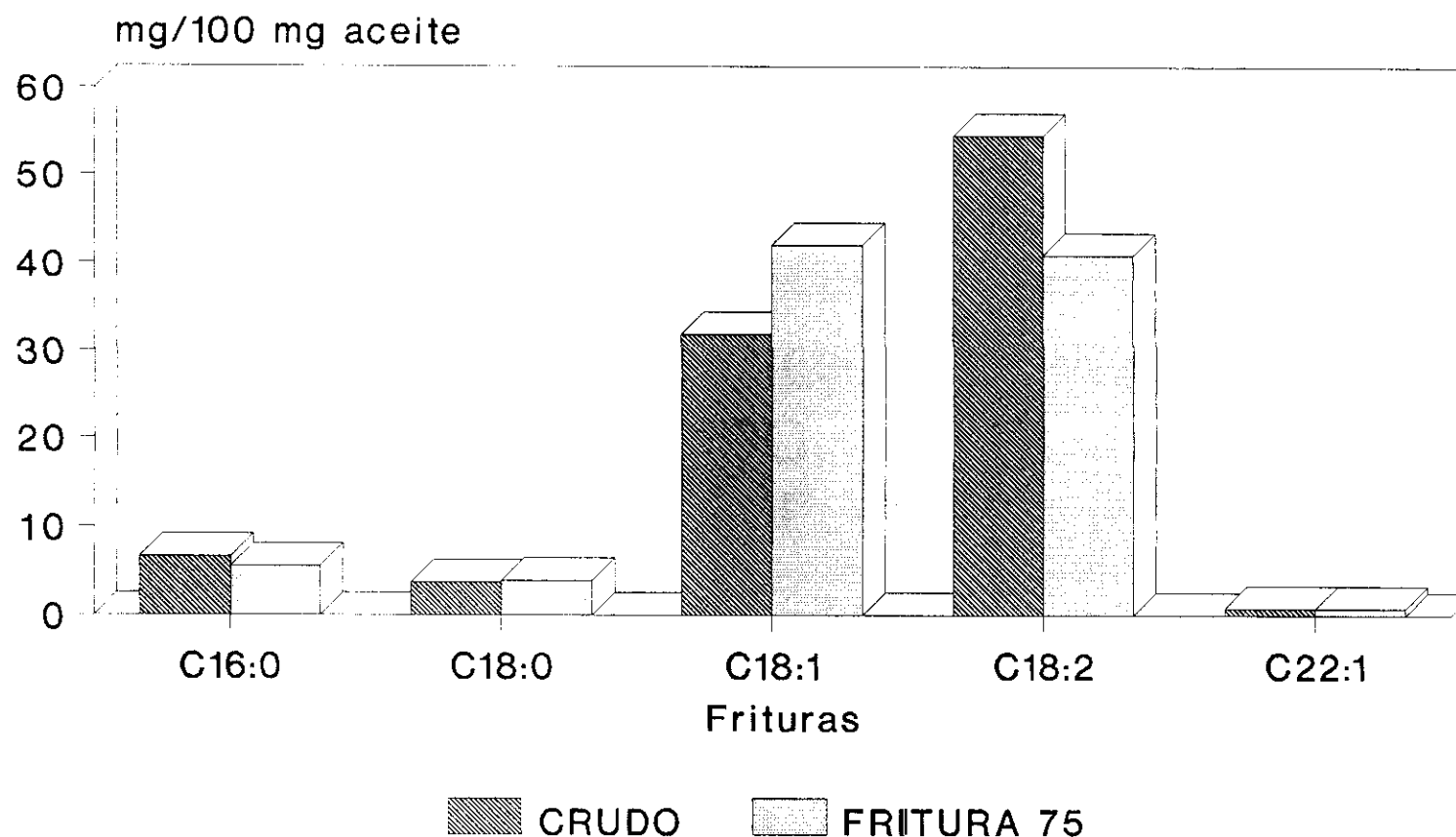


SATURADOS ▪ Esteárico+Palmitico ; MONOINSATURADOS ▪ Oleico ; POLIINSATURADOS ▪ Linoléico

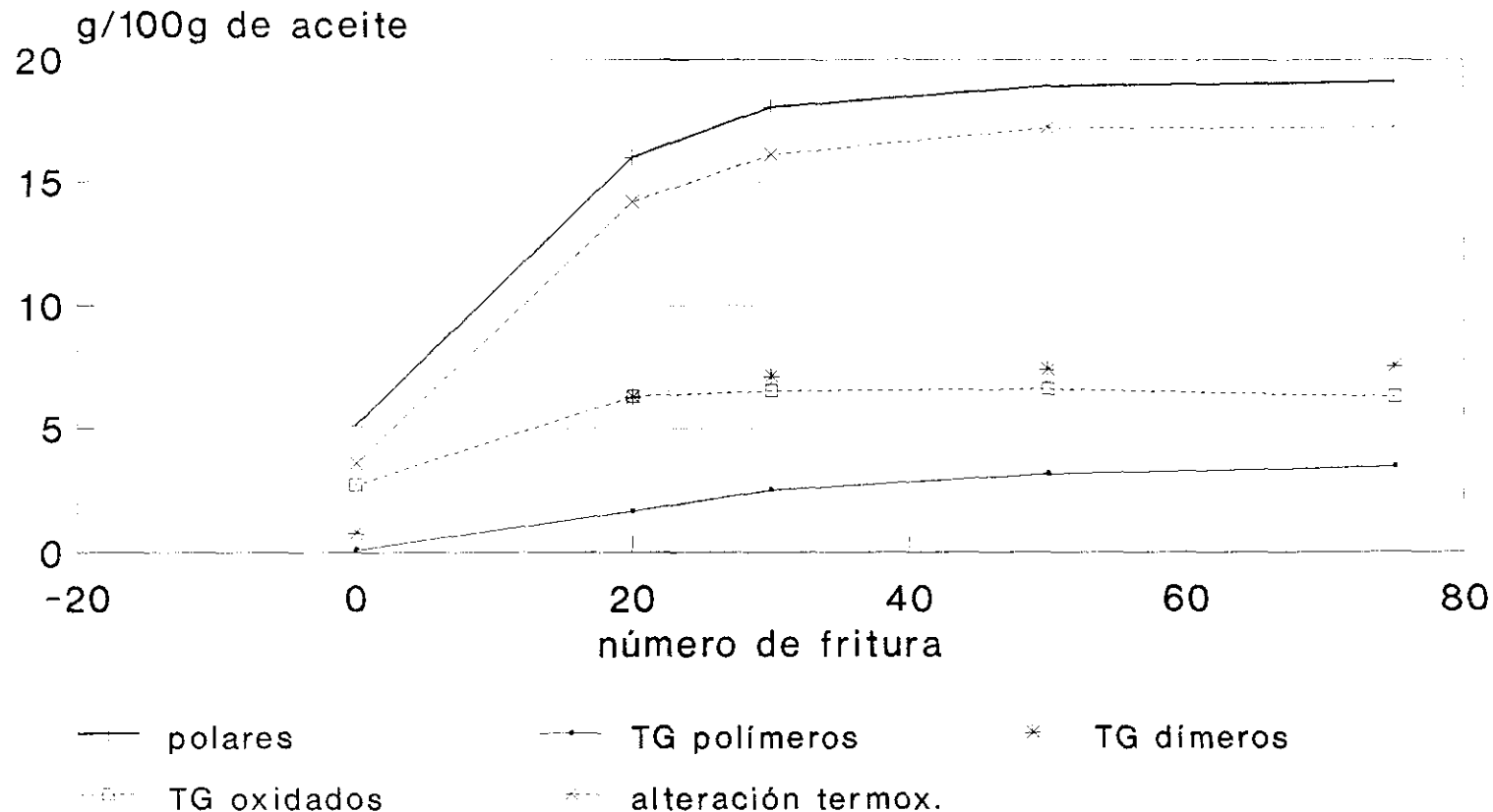
GRAFICA 11.EVOLUCION EN EL ACEITE DE GIRASOL DE LOS ACIDOS GRASOS MAYORITARIOS CON EL NUMERO DE FRITURAS.



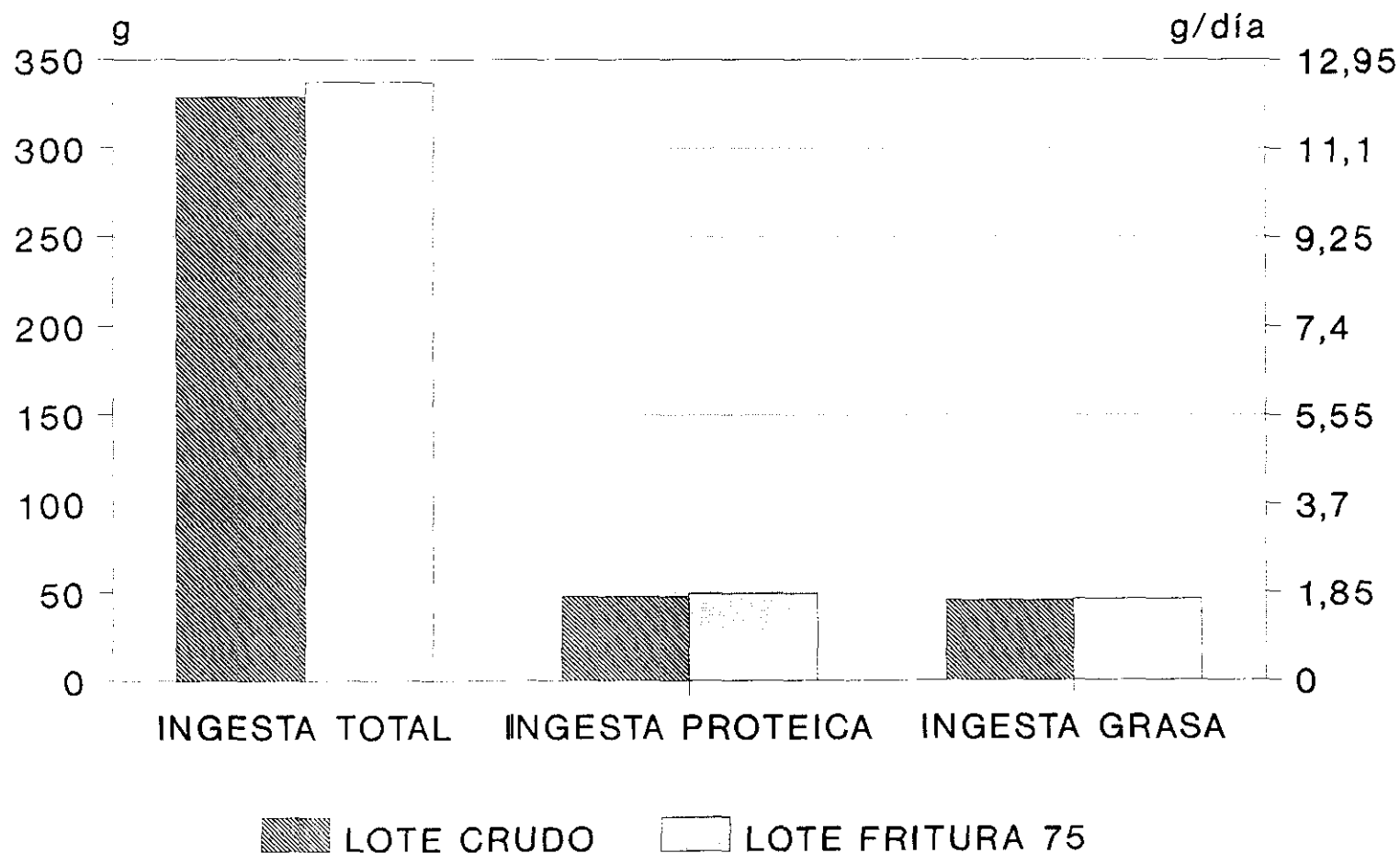
GRAFICA 12.EVOLUCION EN EL ACEITE DE GIRASOL DE LOS ACIDOS GRASOS MAYORITARIOS CON EL NUMERO DE FRITURAS.



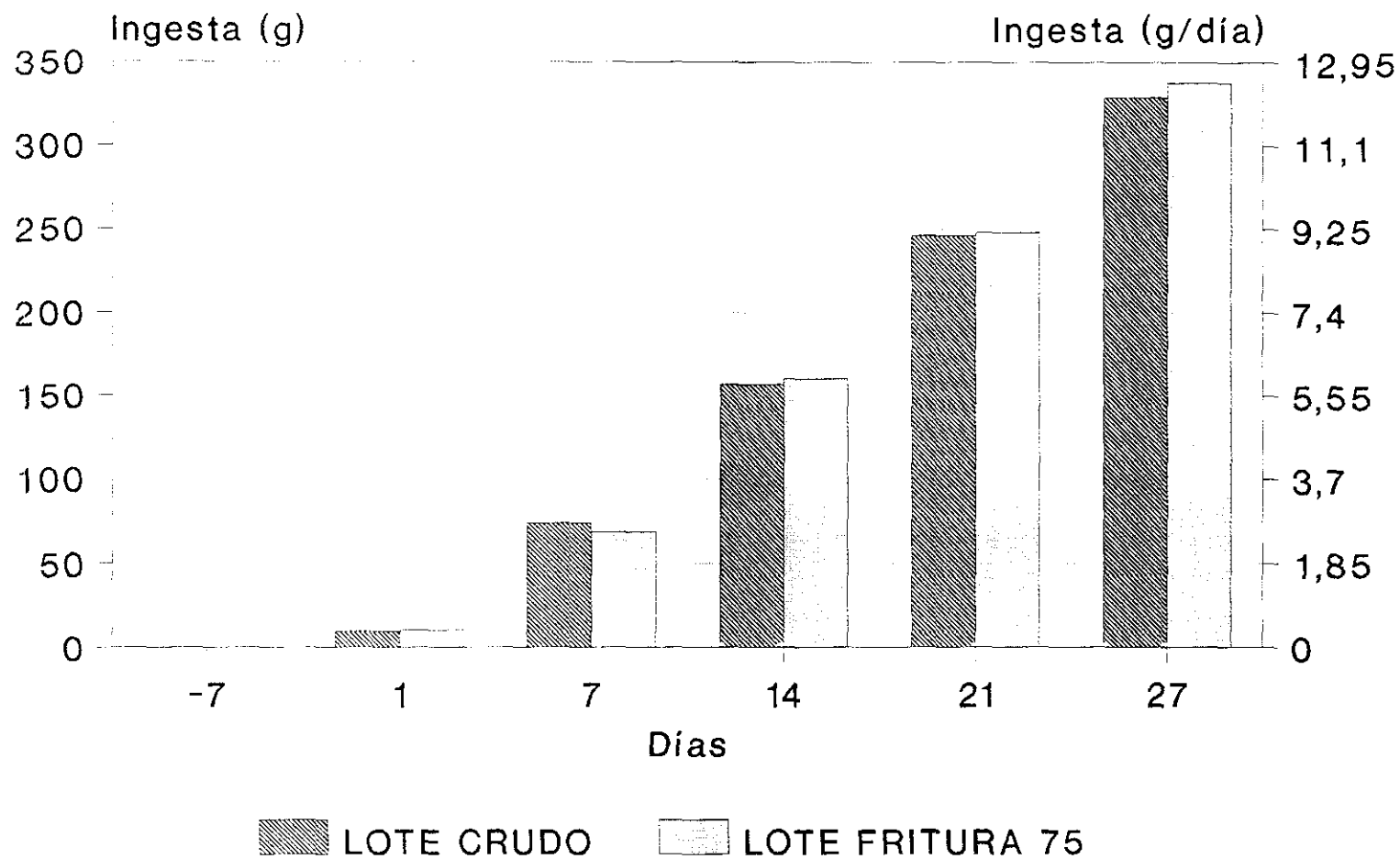
GRAFICA 14.ALTERACION TERMOXIDATIVA DEL ACEITE DE GIRASOL UTILIZADO EN 75 FRITURAS SUCESIVAS DE PATATAS.



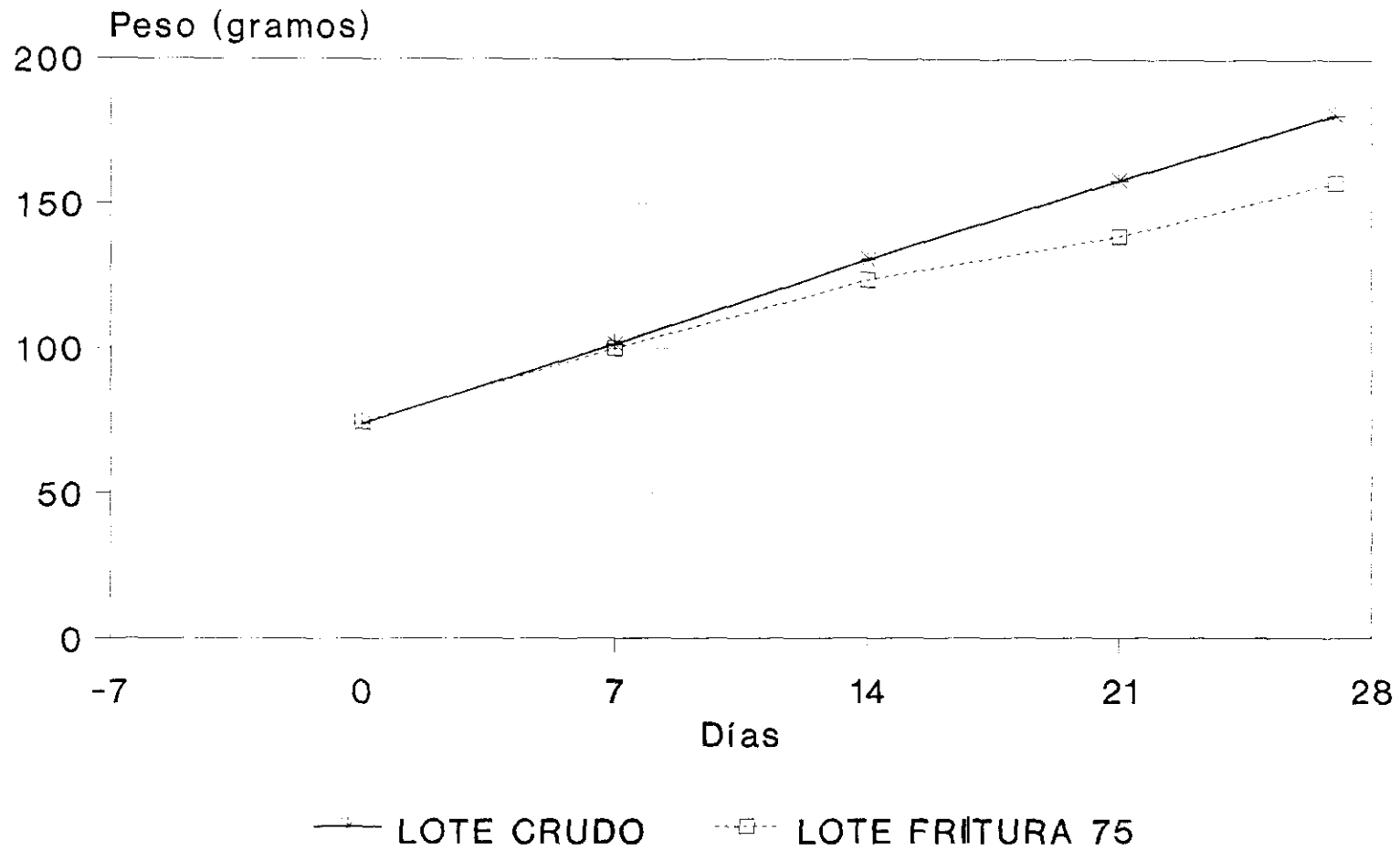
GRAFICA 15.INGESTA TOTAL, PROTEICA Y GRASA DE LOS LOTES EXPERIMENTALES.



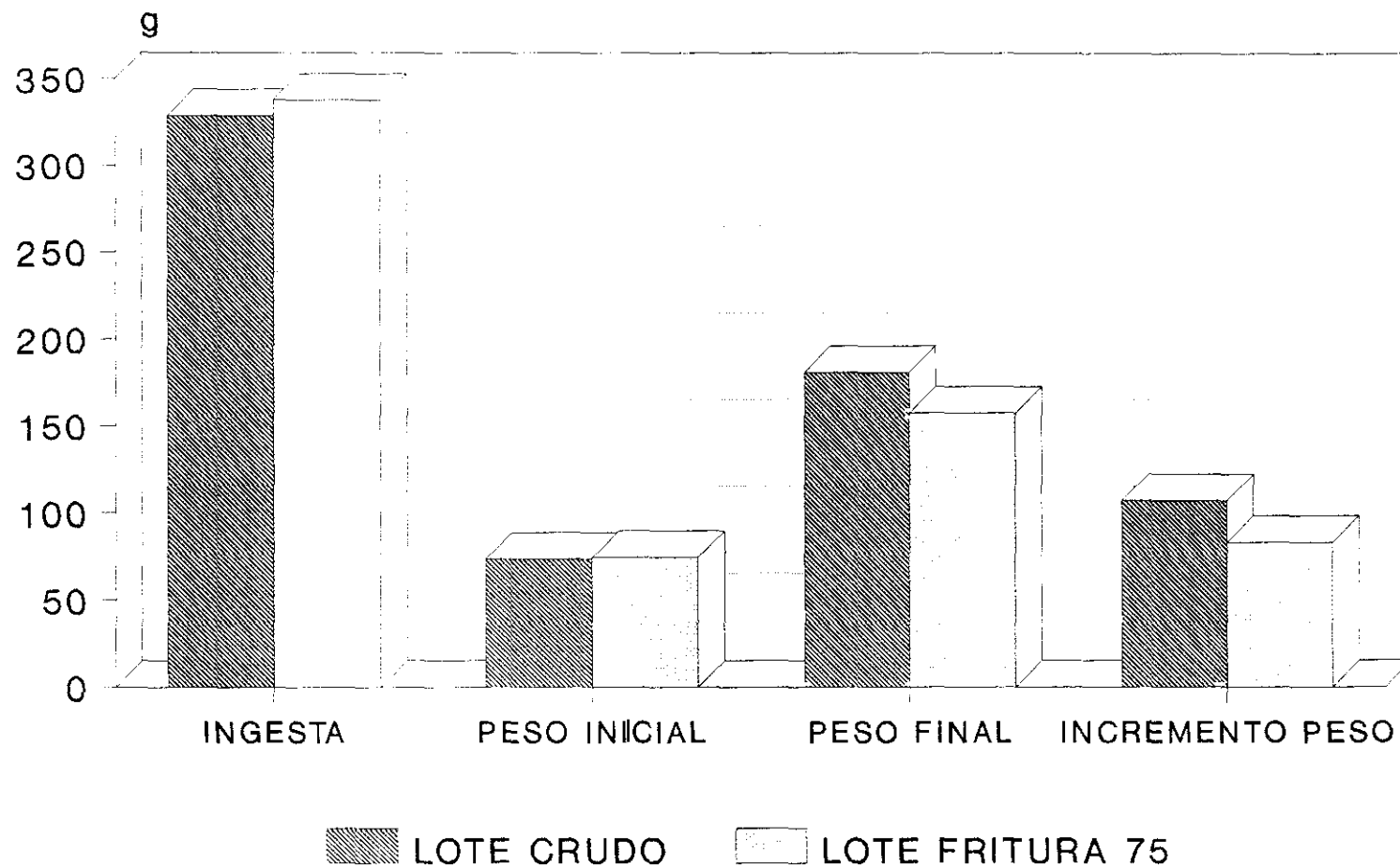
GRAFICA 16.EVOLUCION DE LA INGESTA EN EL PERIODO EXPERIMENTAL.



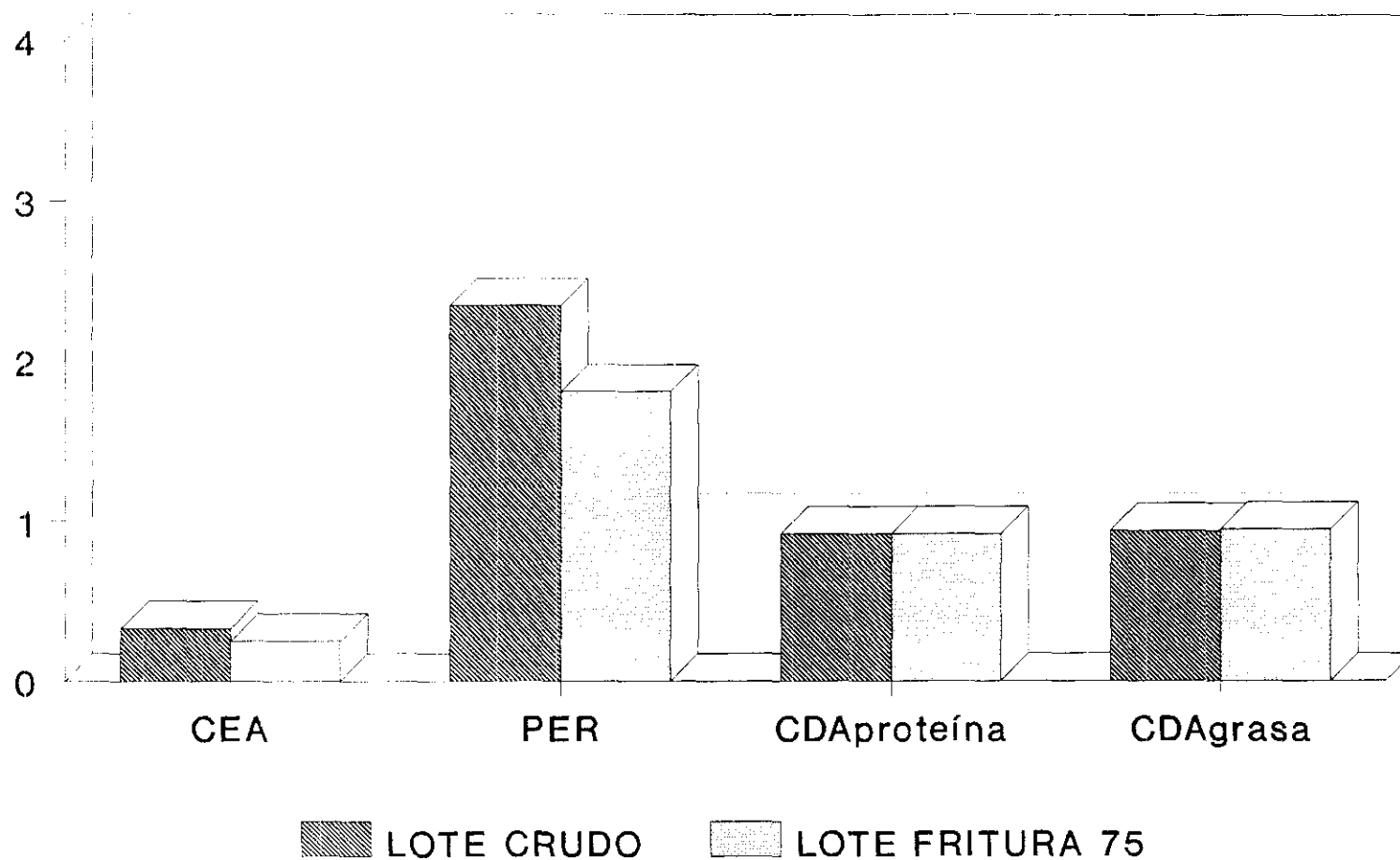
GRAFICA 17. VARIACION DEL PESO EN EL PERIODO EXPERIMENTAL.



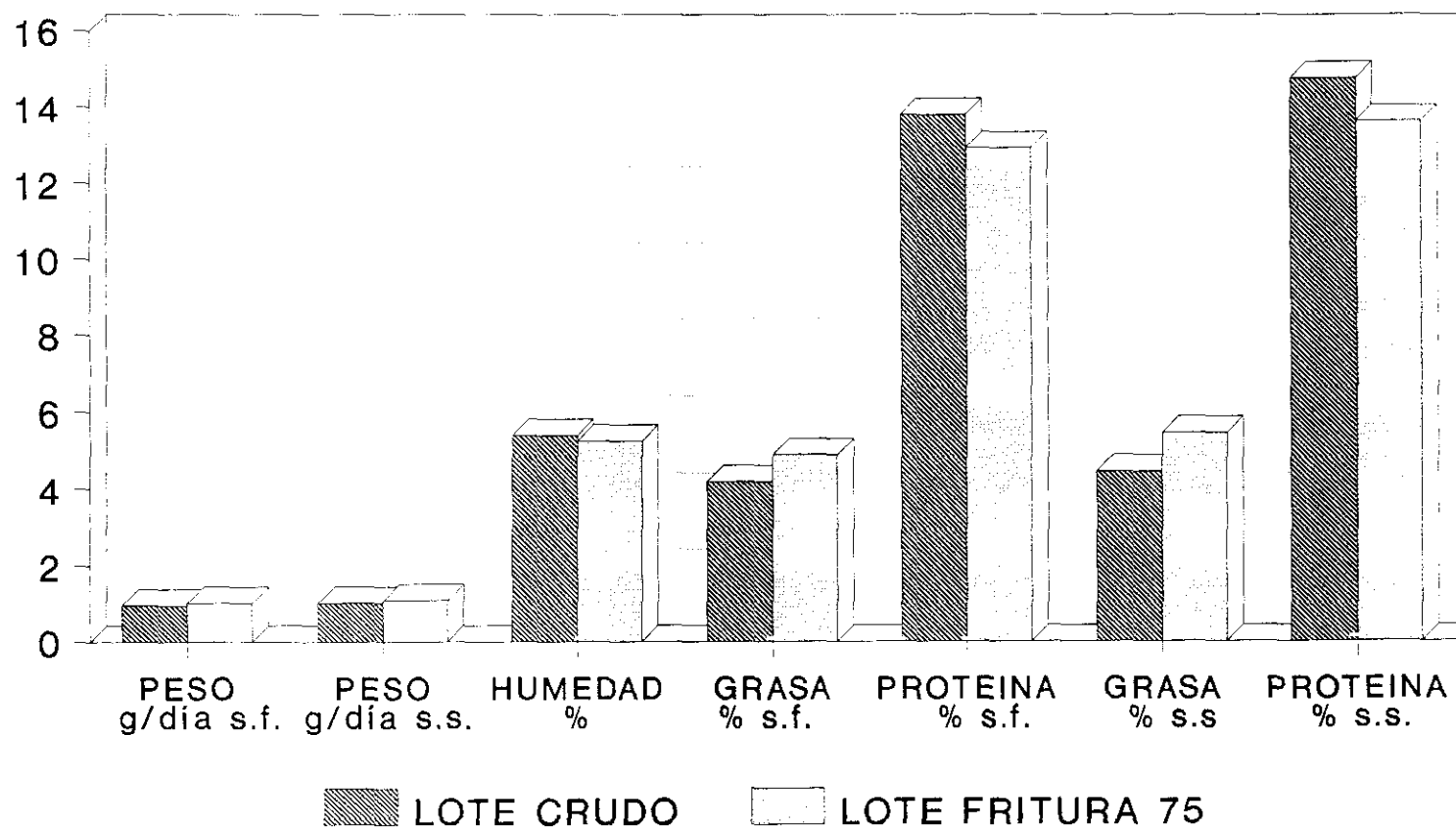
GRAFICA 18.INGESTA E INCREMENTO DE PESO EN LOS LOTES EXPERIMENTALES.



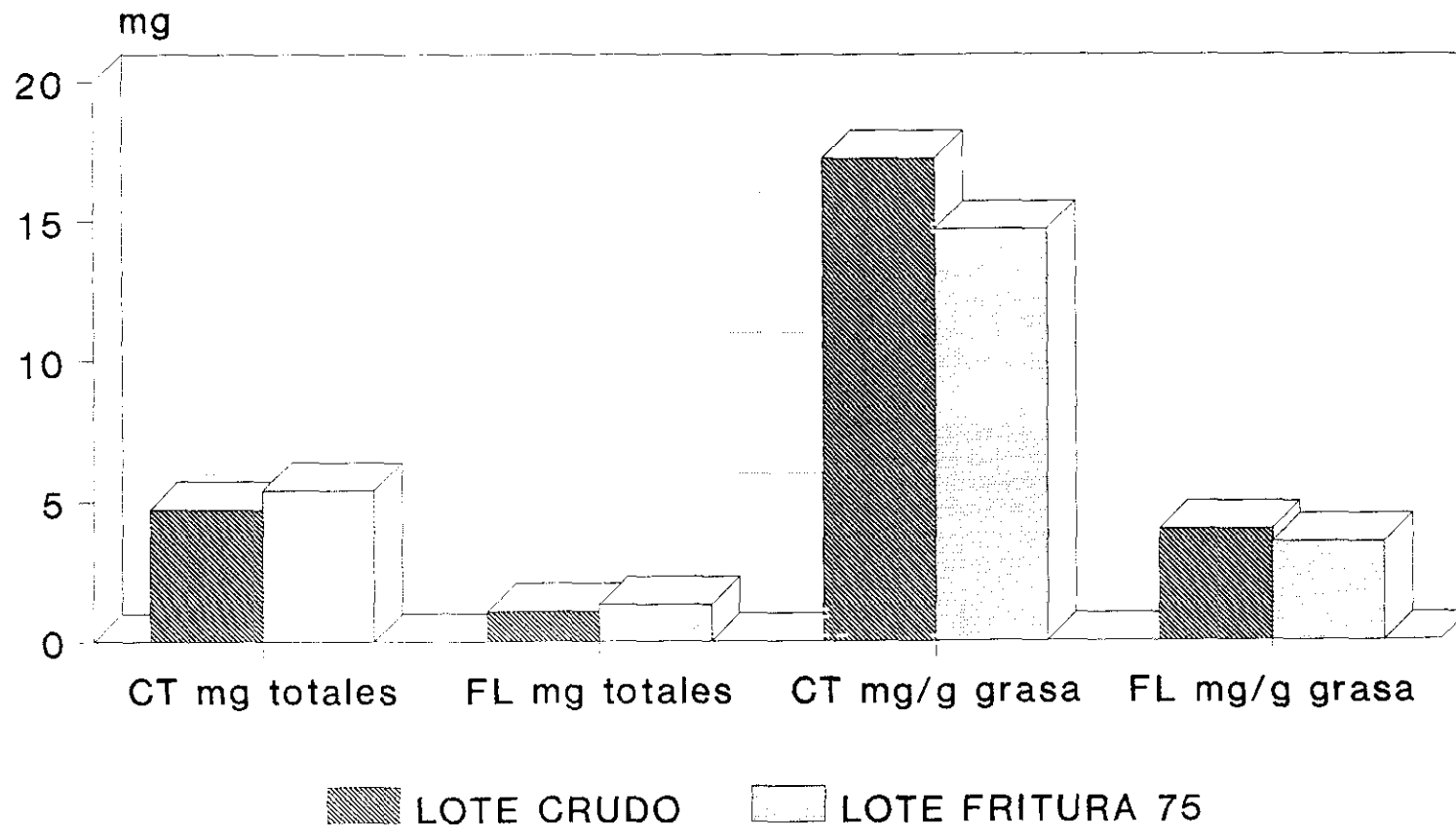
GRAFICA 19.CEA, PER Y CDA DE LA PROTEINA Y GRASA DE LOS LOTES EXPERIMENTALES.



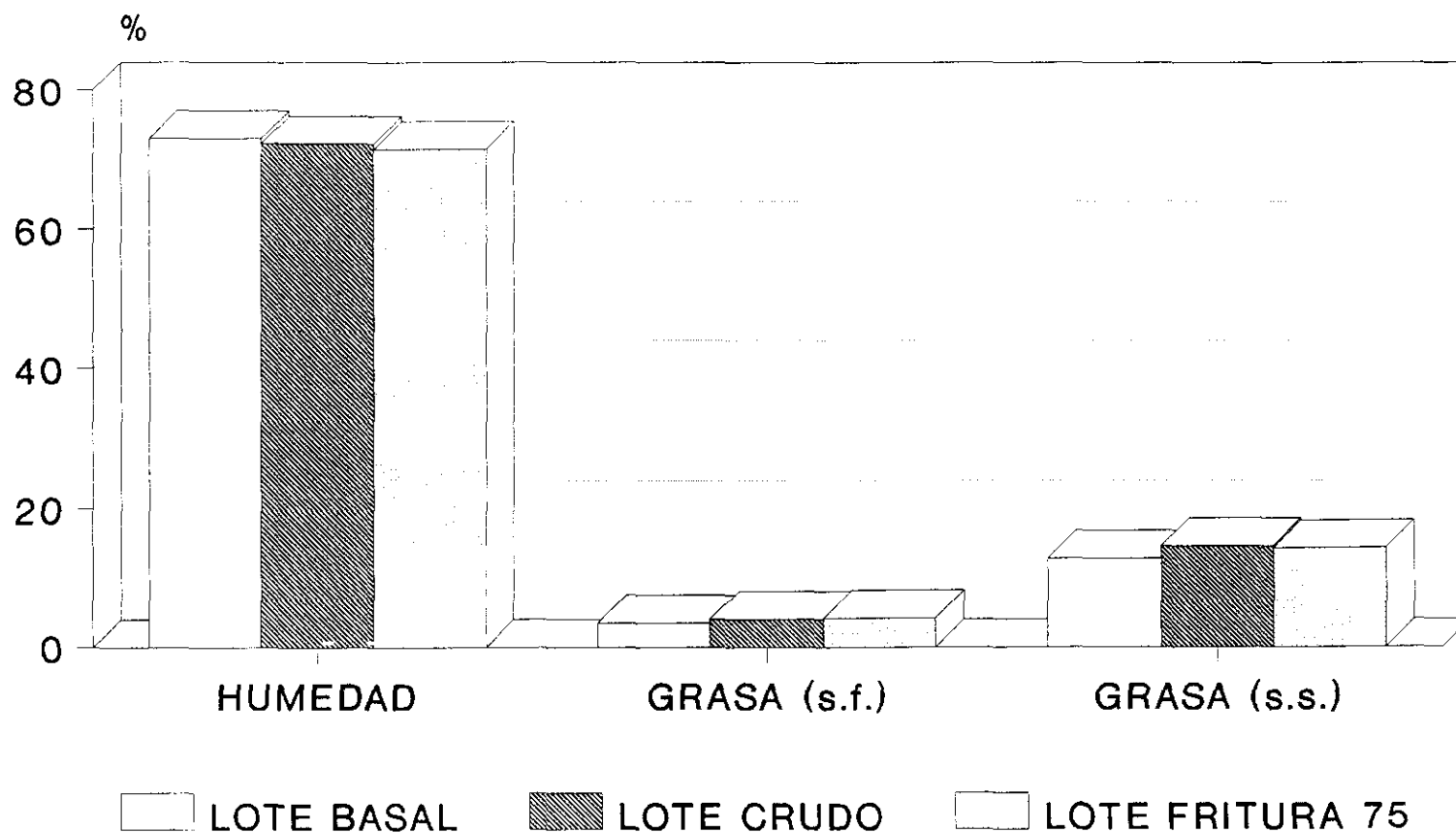
GRAFICA 20. PESO Y COMPOSICION PORCENTUAL EN HUMEDAD, GRASA Y PROTEINA EN HECES DE LOS LOTES EXPERIMENTALES.



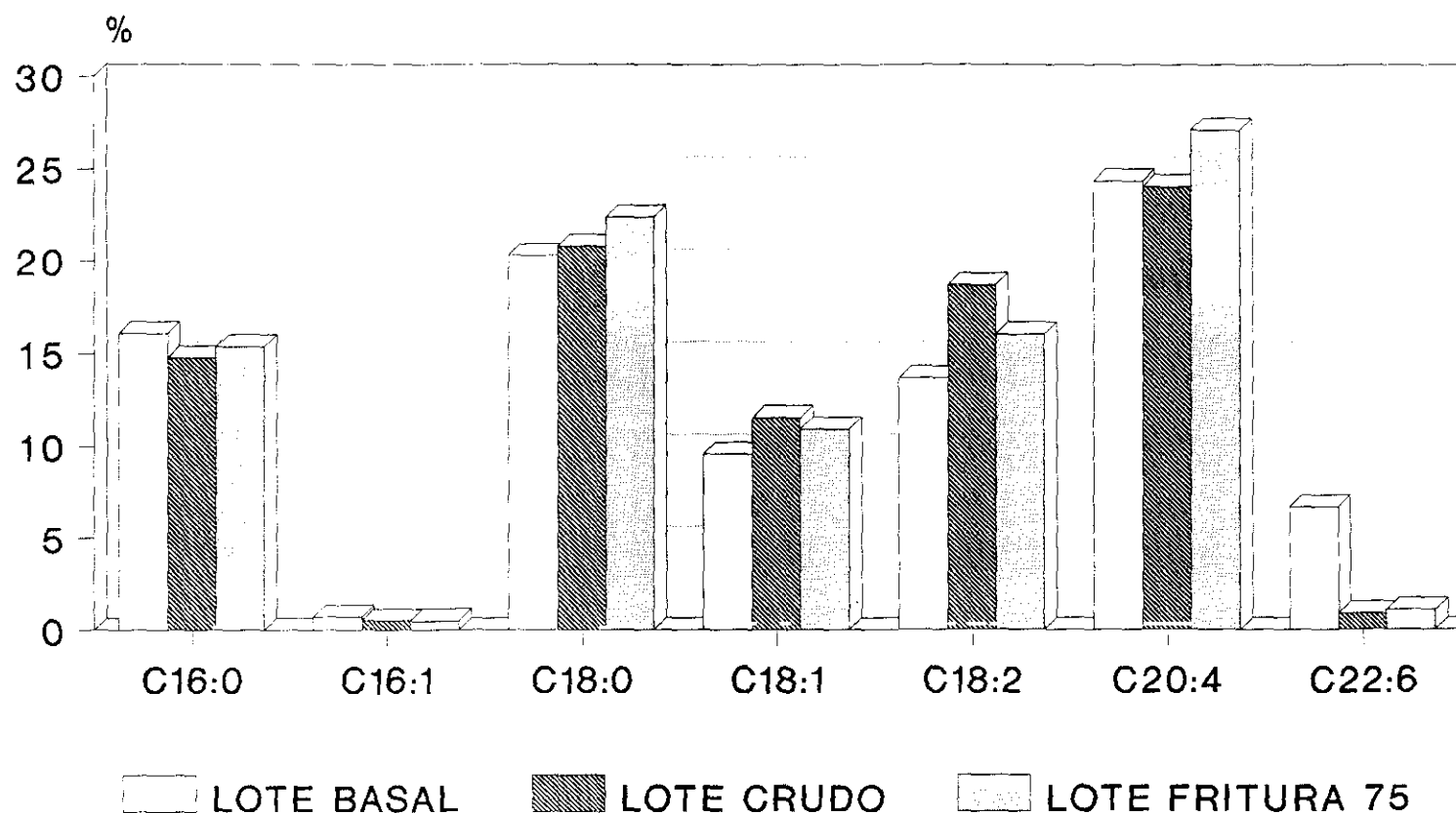
GRAFICA 21. CONCENTRACION DE COLESTEROL TOTAL (CT) Y FOSFOLIPIDOS (FL) EN HECES DE LOS LOTES EXPERIMENTALES.



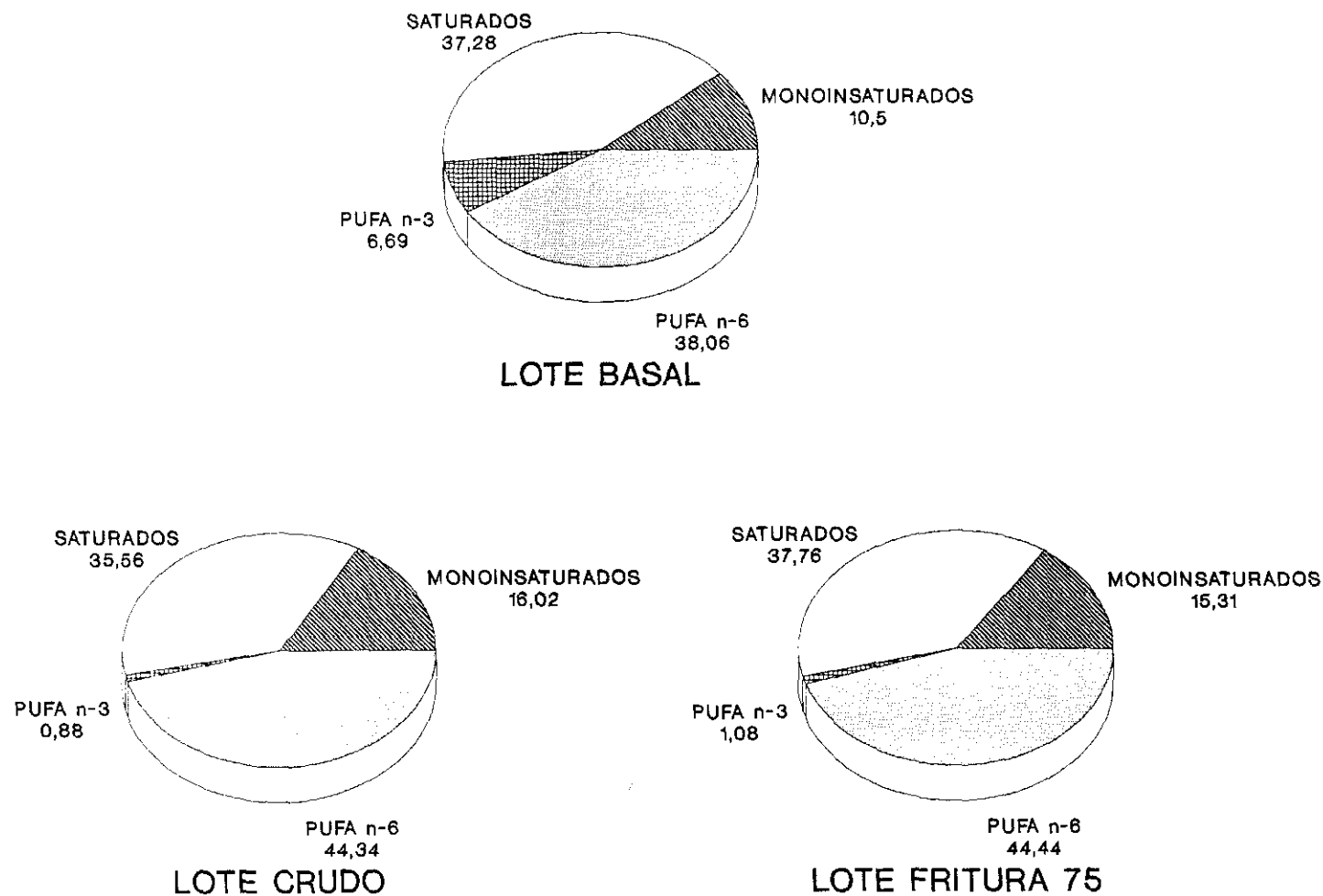
GRAFICA 22.COMPOSICION PORCENTUAL EN HUMEDAD Y GRASA DE LOS HIGADOS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES.



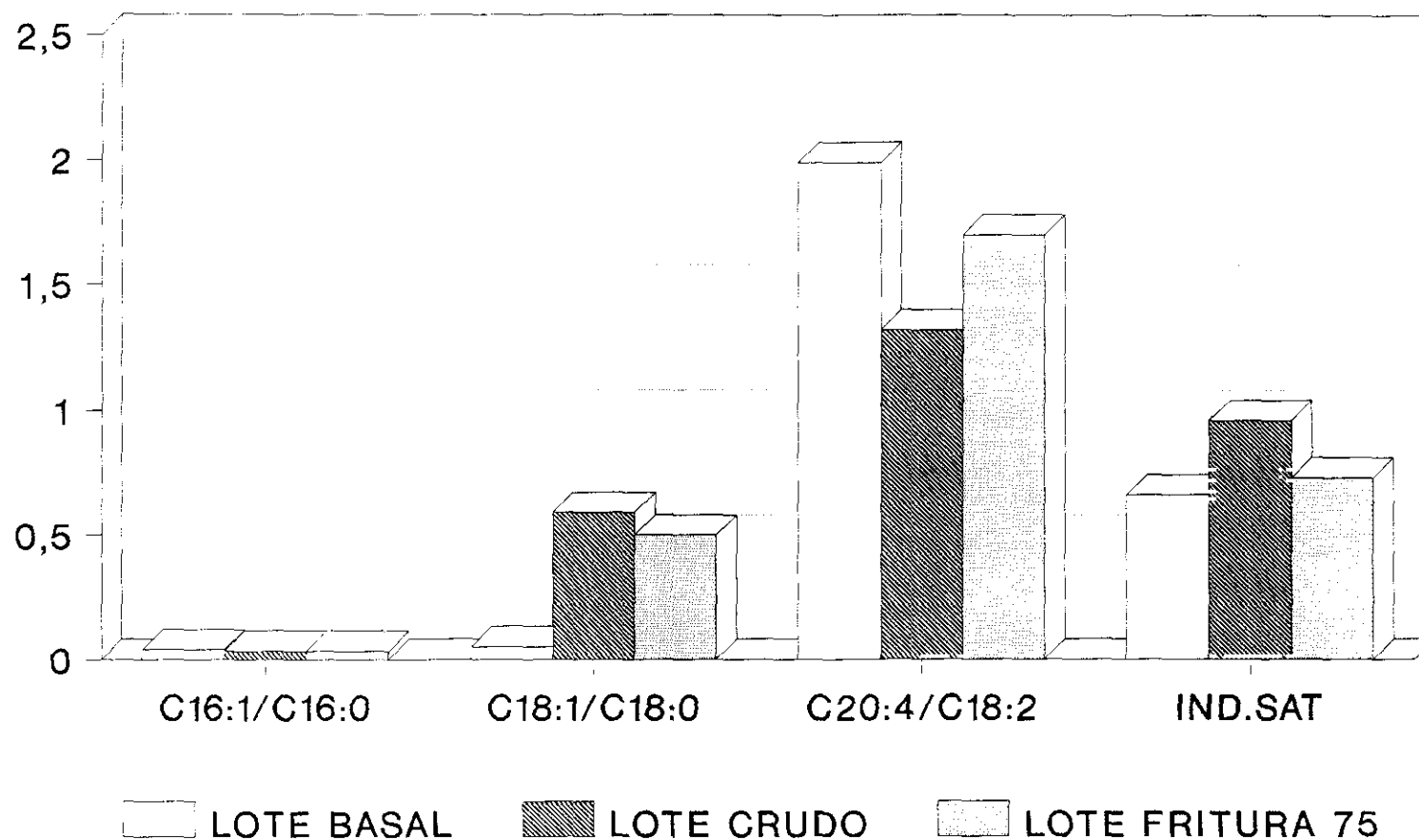
GRAFICA 26.COMPOSICION PORCENTUAL
HEPATICA DE LOS ACIDOS GRASOS MAYORITA-
RIOS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES.



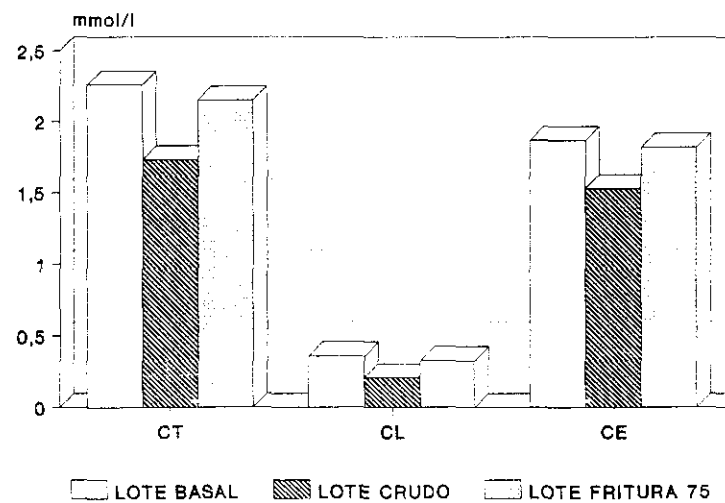
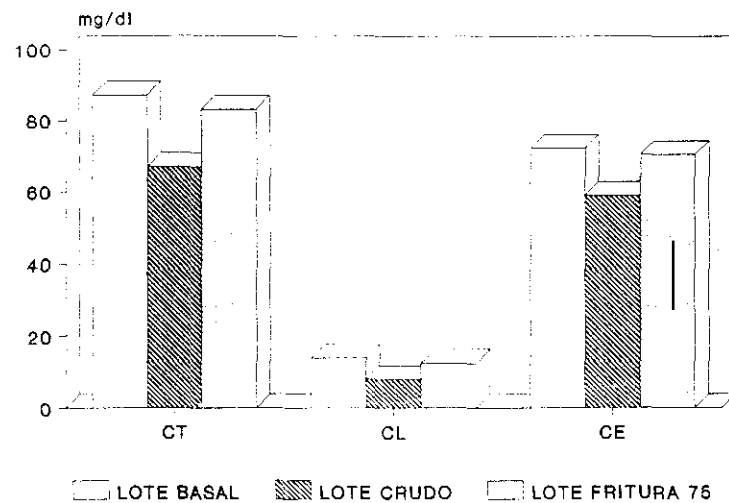
GRAFICA 27.COMPOSICION PORCENTUAL DE LAS FAMILIAS DE ACIDOS GRASOS EN LOS HIGADOS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES.



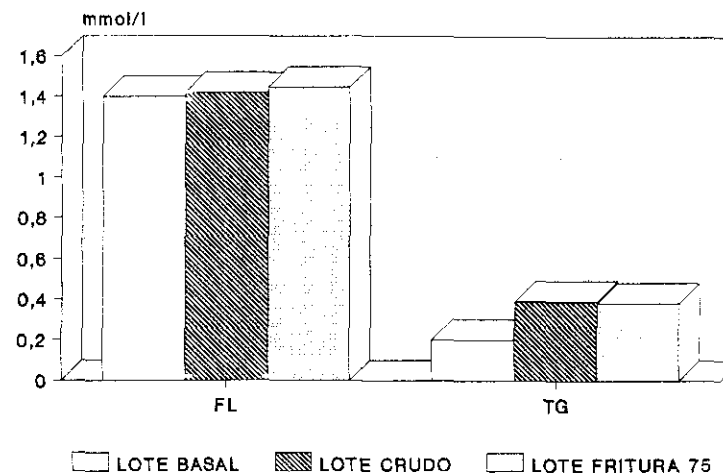
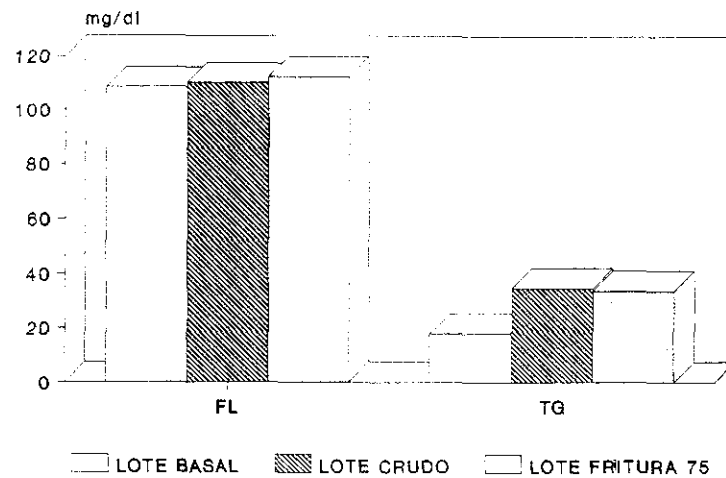
GRAFICA 28. RELACIONES AC.PALMITOLEICO/
/AC.PALMITICO,AC.OLEICO/AC.ESTEARICO,
AC.ARAQUIDONICO/AC.LINOLEICO E INDICE DE
SATURACION EN HIGADOS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES.



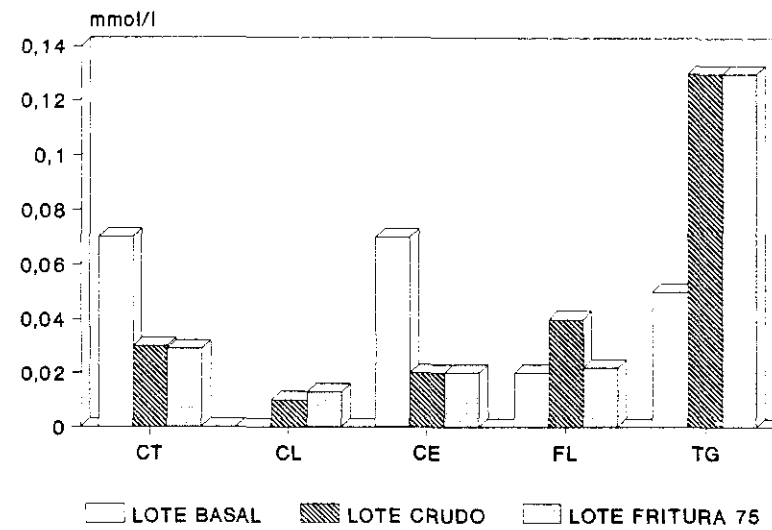
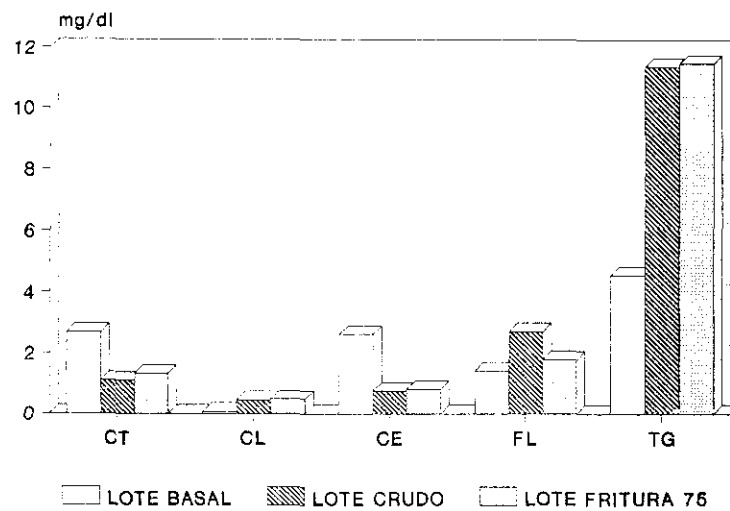
GRAFICA 29. CONCENTRACION SERICA DE COLESTEROL TOTAL (CT), LIBRE (CL) Y ESTERIFICADO (CE) EN LOS LOTES EXPERIMENTALES.



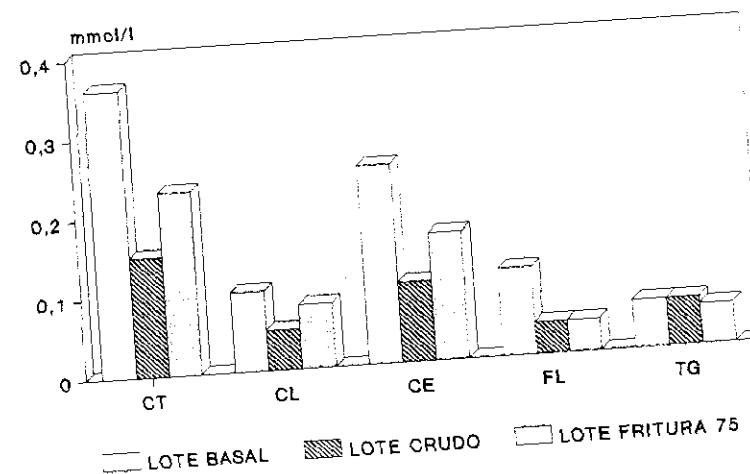
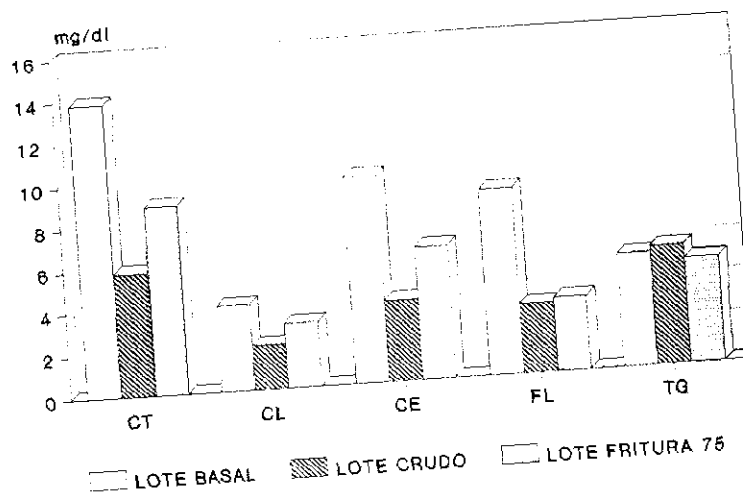
GRAFICA 30. CONCENTRACION SERICA DE FOSFOLIPIDOS (FL) Y TRIGLICERIDOS (TG) EN LOS LOTES EXPERIMENTALES.



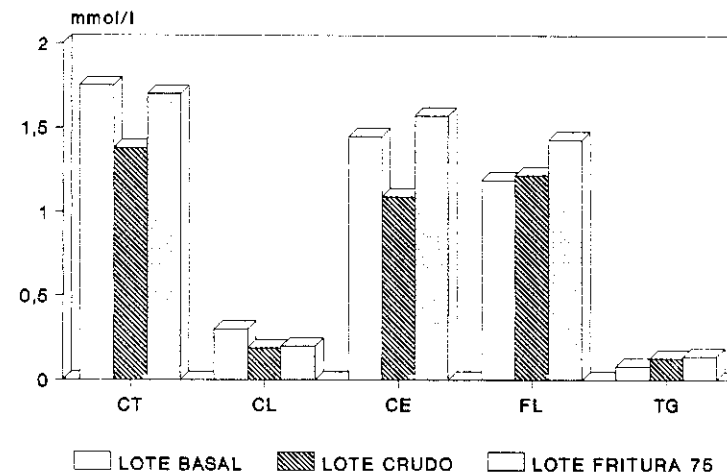
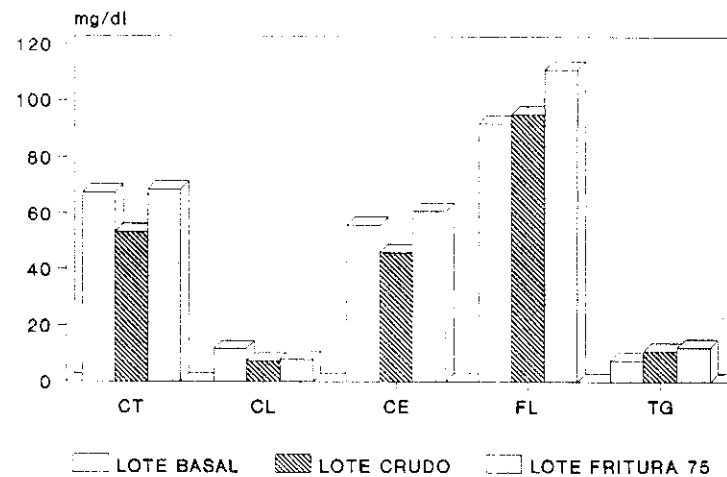
GRAFICA 31. CONCENTRACION LIPIDICA DE LAS VLDL PLASMATICAS EN LOS LOTES EXPERIMENTALES.



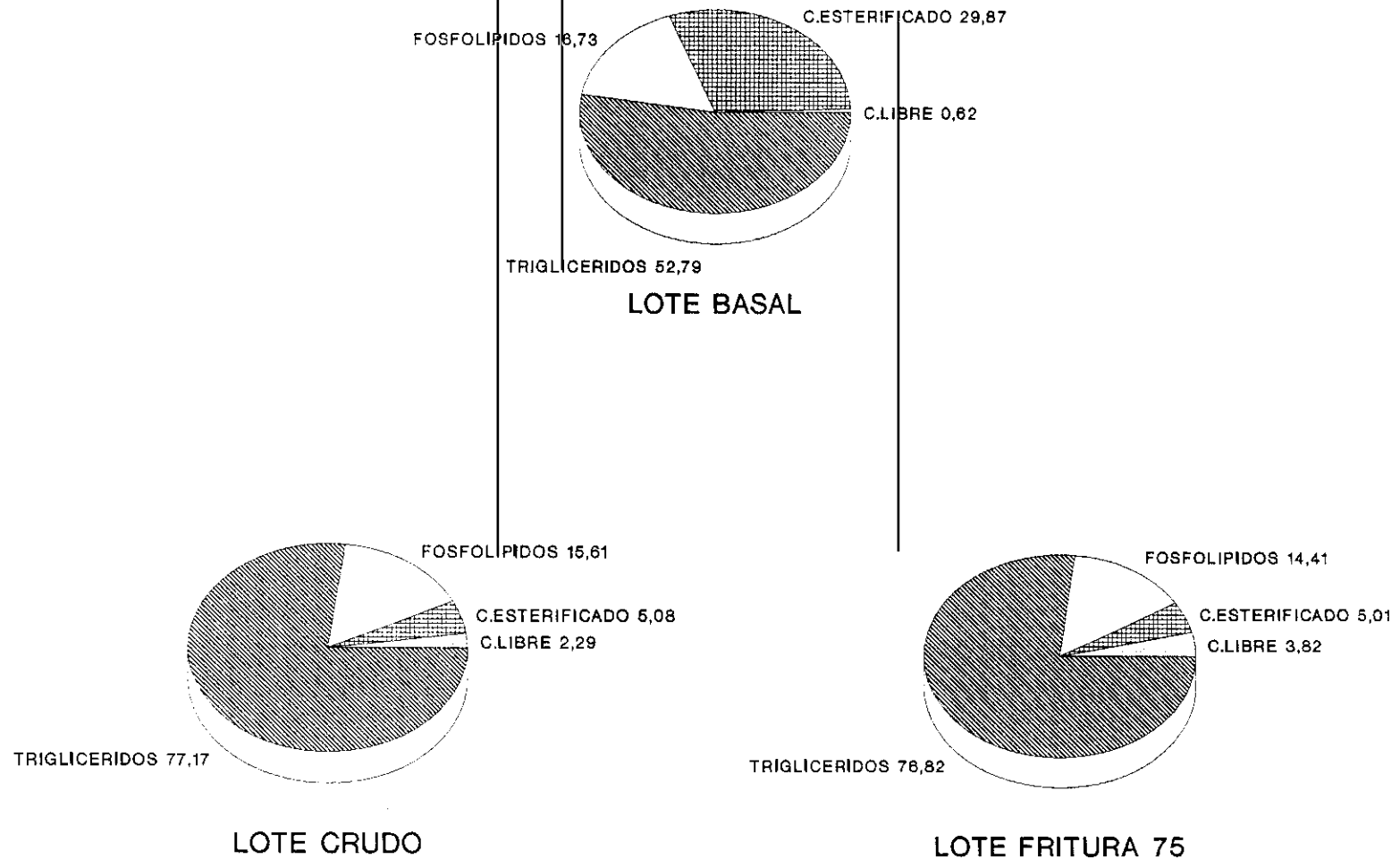
GRAFICA 32. CONCENTRACION LIPIDICA DE LAS LDL PLASMATICAS EN LOS LOTES EXPERIMENTALES.



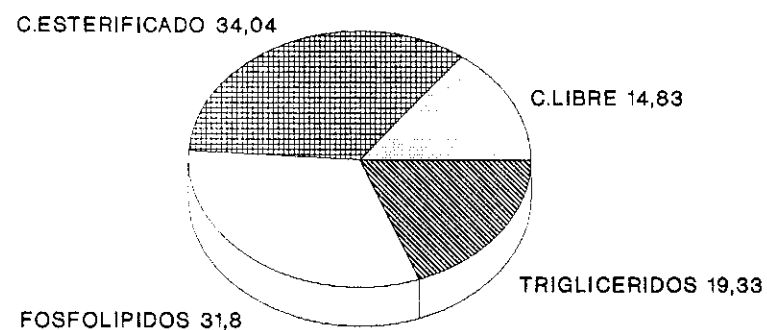
GRAFICA 33. CONCENTRACION LIPIDICA DE LAS HDL PLASMATICAS EN LOS LOTES EXPERIMENTALES.



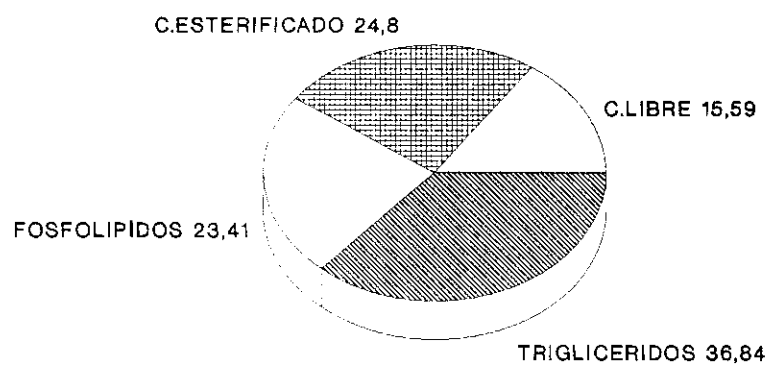
GRAFICA 34.COMPOSICION PORCENTUAL LIPIDICA DE LAS VLDL SERICAS EN LOS LOTES EXPERIMENTALES.



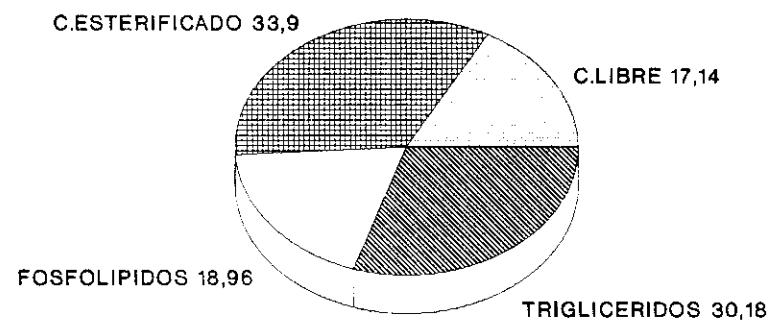
GRAFICA 35.COMPOSICION PORCENTUAL LIPIDICA DE LAS LDL SERICAS EN LOS LOTES EXPERIMENTALES.



LOTE BASAL

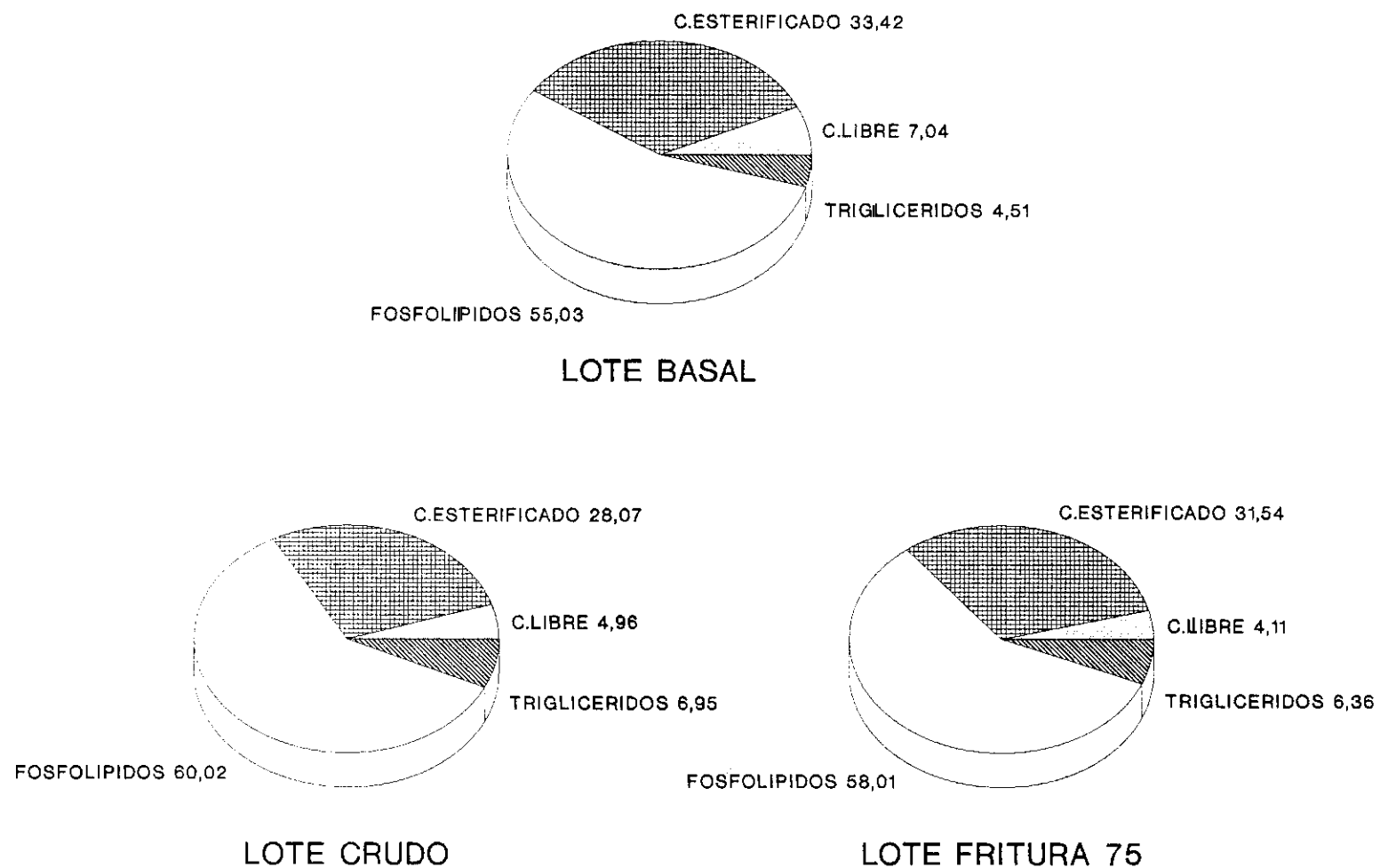


LOTE CRUDO

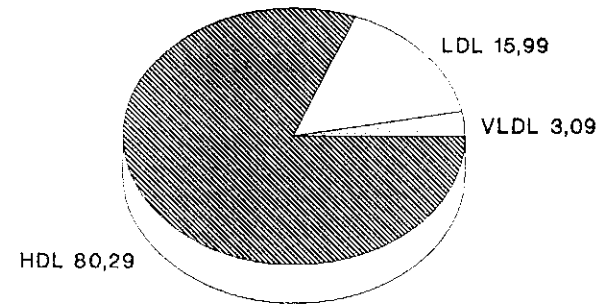


LOTE FRITURA 75

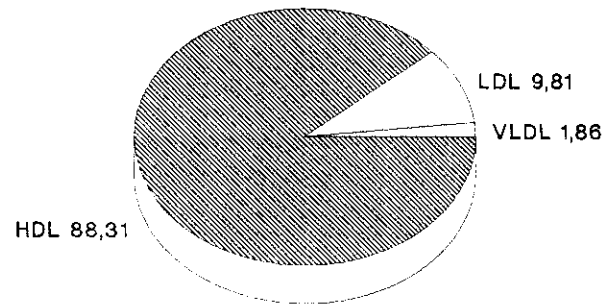
GRAFICA 36.COMPOSICION PORCENTUAL LIPIDICA DE LAS HDL SERICAS EN LOS LOTES EXPERIMENTALES .



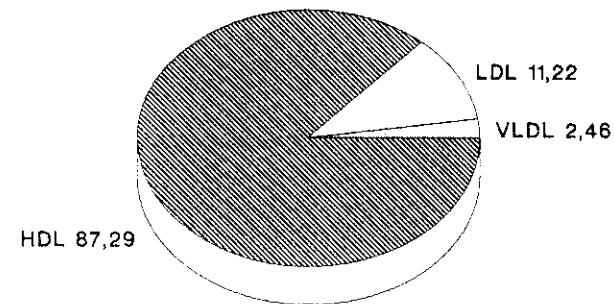
GRAFICA 37. DISTRIBUCION PORCENTUAL DE COLESTEROL
TOTAL EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS
DE LOS LOTES EXPERIMENTALES.



LOTE BASAL

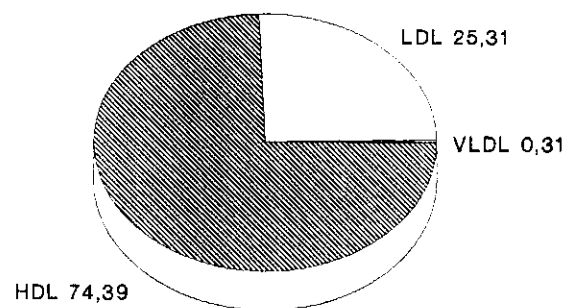


LOTE CRUDO

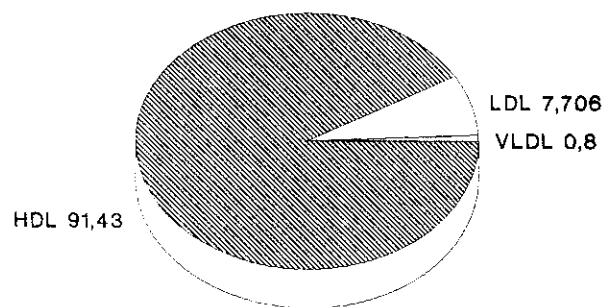


LOTE FRITURA 75

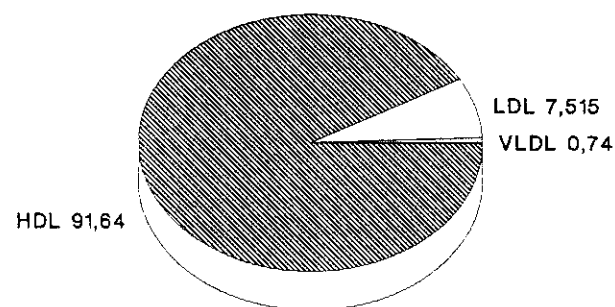
GRAFICA 38. DISTRIBUCION PORCENTUAL DE COLESTEROL LIBRE EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES.



LOTE BASAL

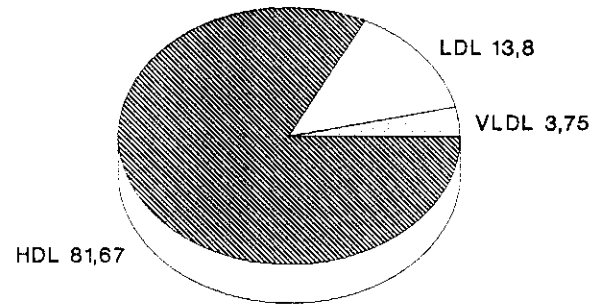


LOTE CRUDO

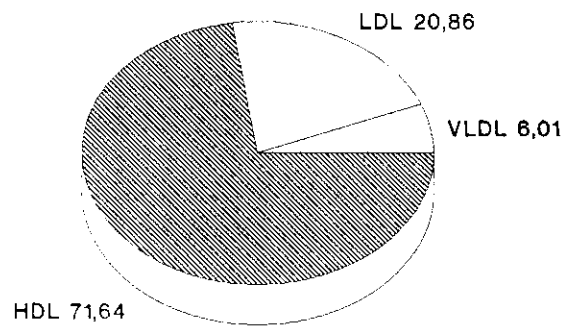


LOTE FRITURA 75

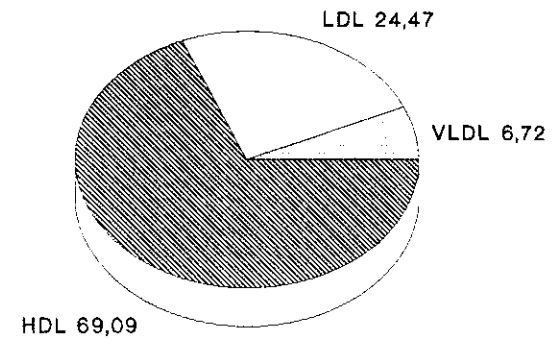
GRAFICA 39.DISTRIBUCION PORCENTUAL DE COLESTEROL ESTERIFICADO EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES.



LOTE BASAL

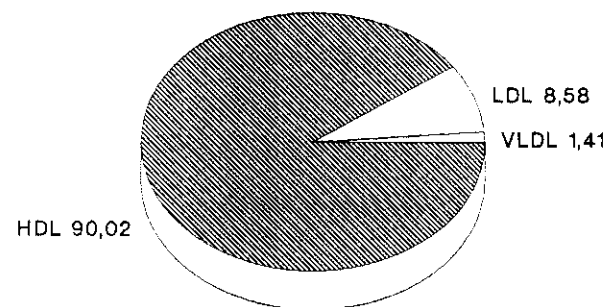


LOTE CRUDO

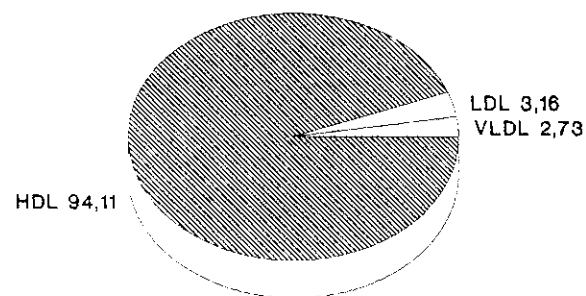


LOTE FRITURA 75

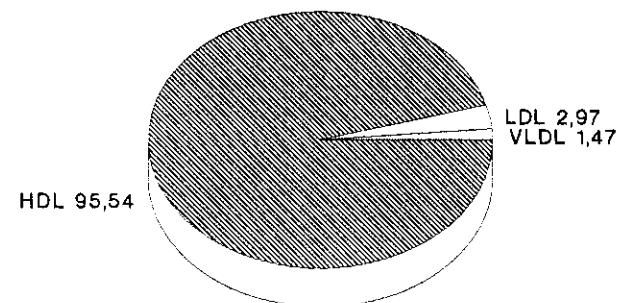
GRAFICA 40. DISTRIBUCION PORCENTUAL DE FOSFOLIPIDOS
EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS DE LOS
LOTES EXPERIMENTALES.



LOTE BASAL

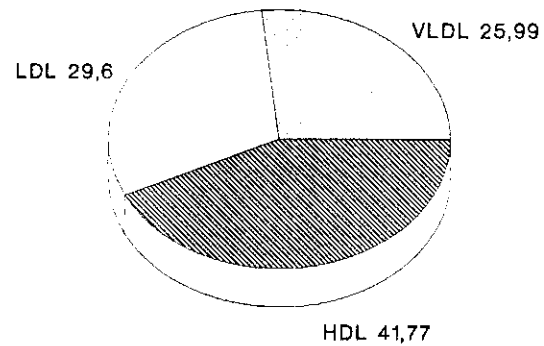


LOTE CRUDO

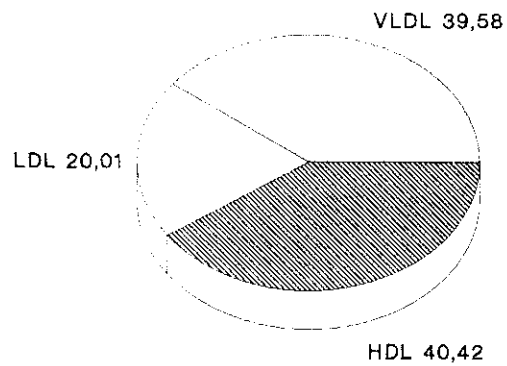


LOTE FRITURA 75

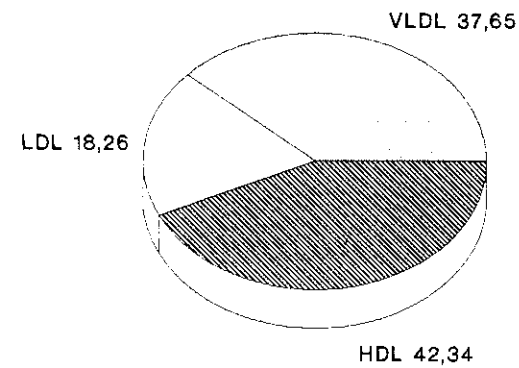
GRAFICA 41.DISTRIBUCION PORCENTUAL DE TRIGLICERIDOS EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES .



LOTE BASAL

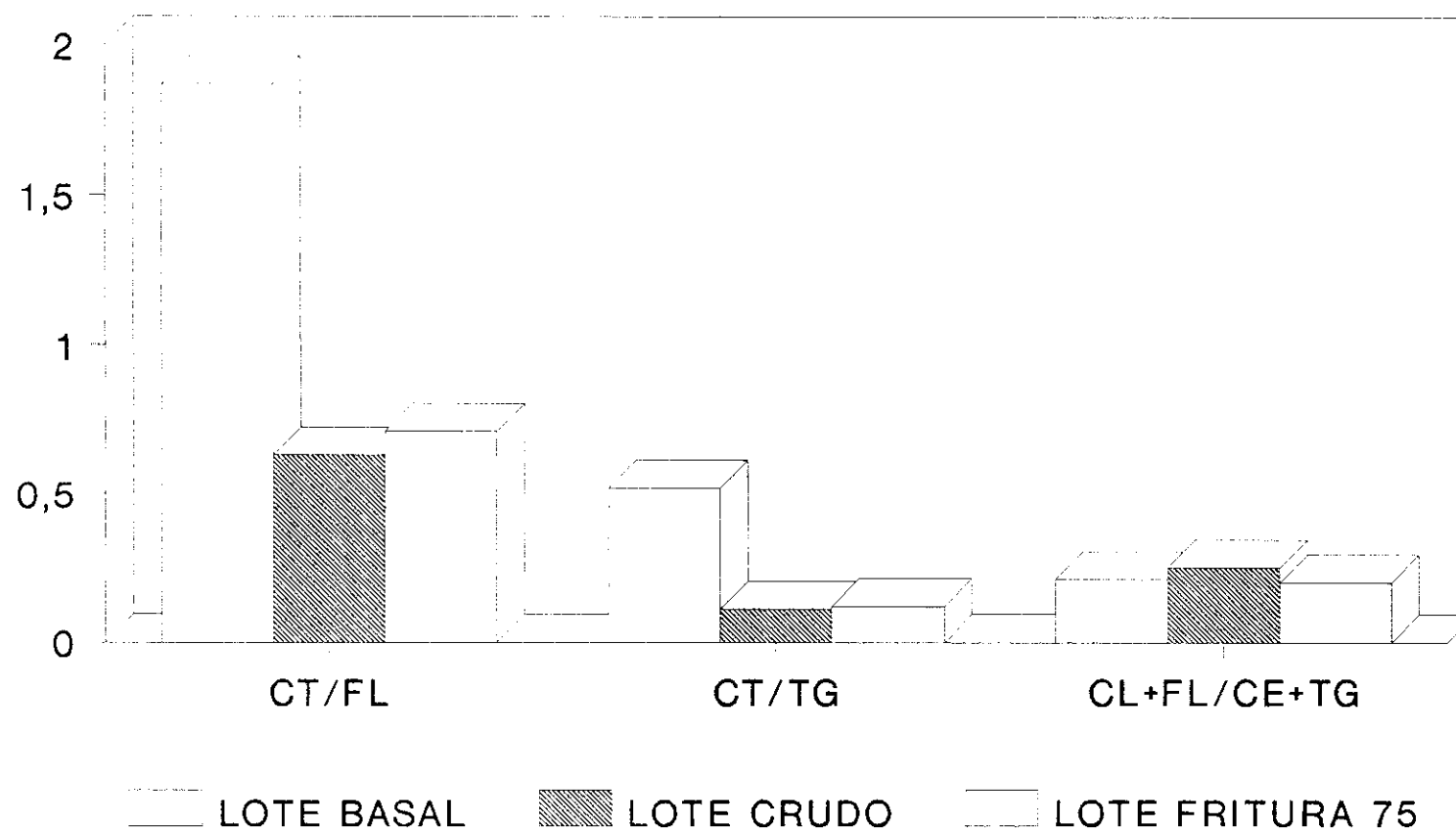


LOTE CRUDO

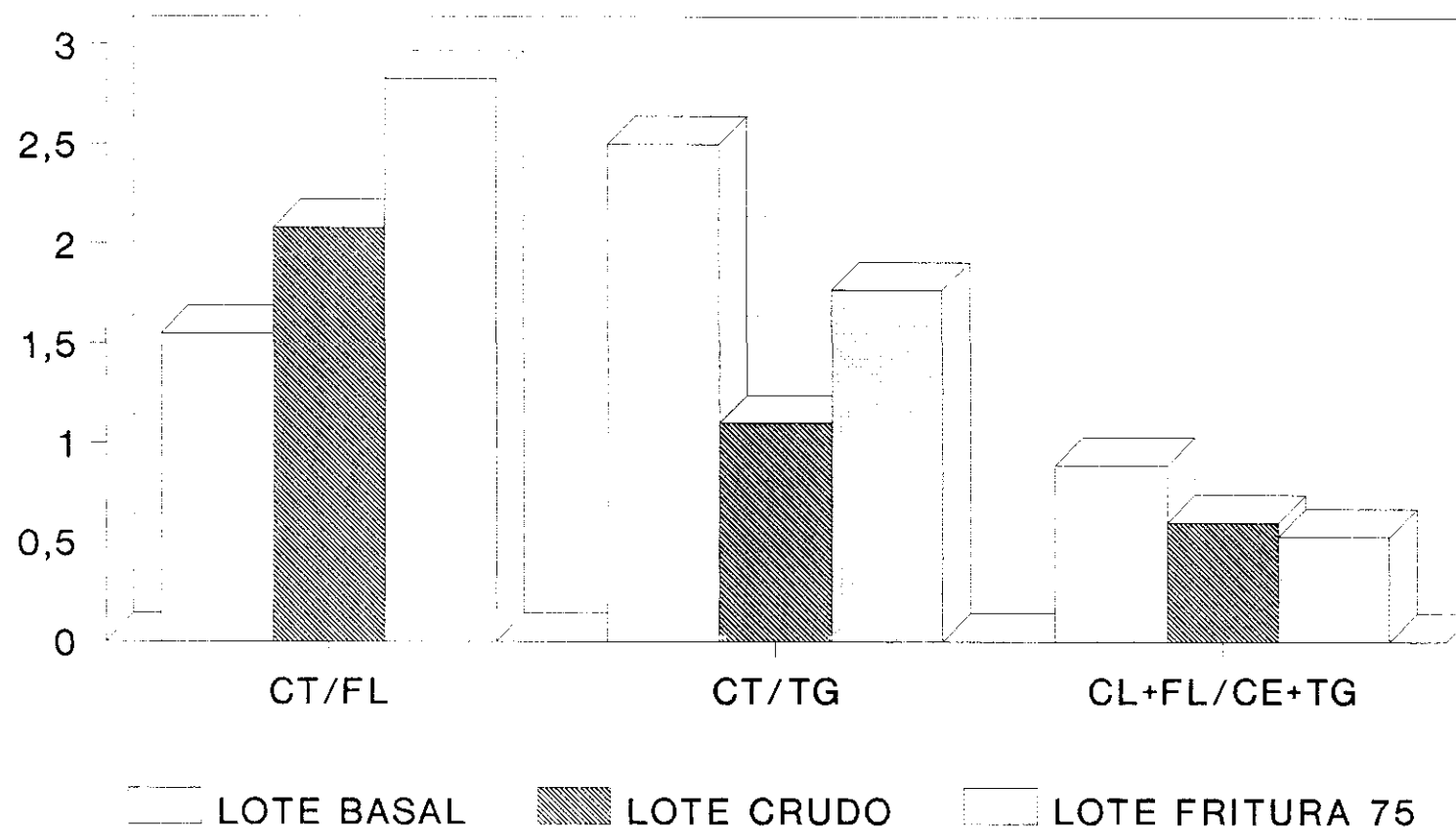


LOTE FRITURA 75

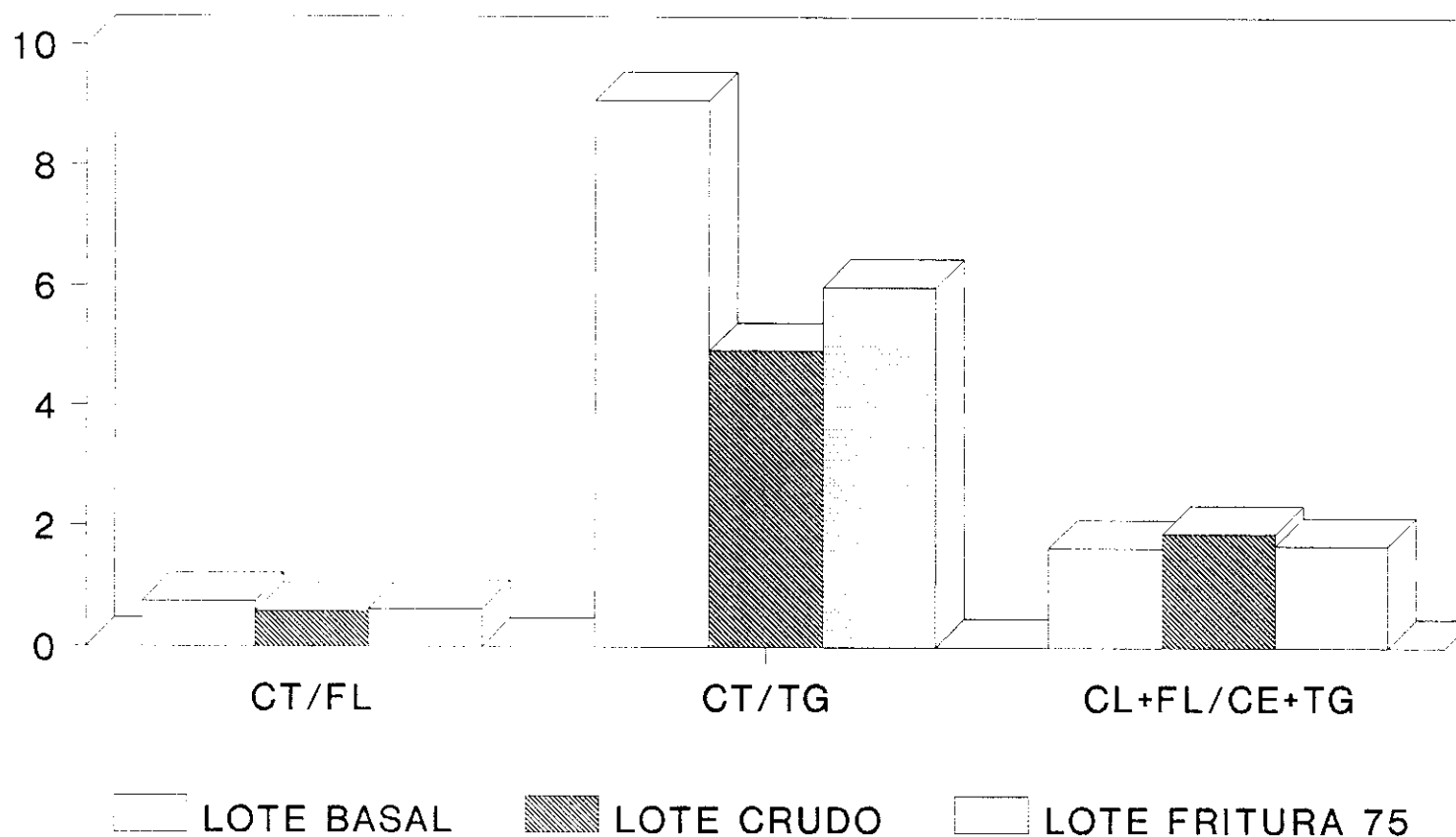
GRAFICA 42.RELACION ENTRE LOS DISTINTOS
COCIENTES EN LAS VLDL DE LOS LOTES
EXPERIMENTALES.



GRAFICA 43.RELACION ENTRE LOS DISTINTOS
COCIENTES EN LAS LDL DE LOS LOTES
EXPERIMENTALES.



GRAFICA 44.RELACION ENTRE LOS DISTINTOS
COCIENTES EN LAS HDL DE LOS LOTES
EXPERIMENTALES.



GRAFICA 45.INDICE DE ESTERIFICACION DE LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES.

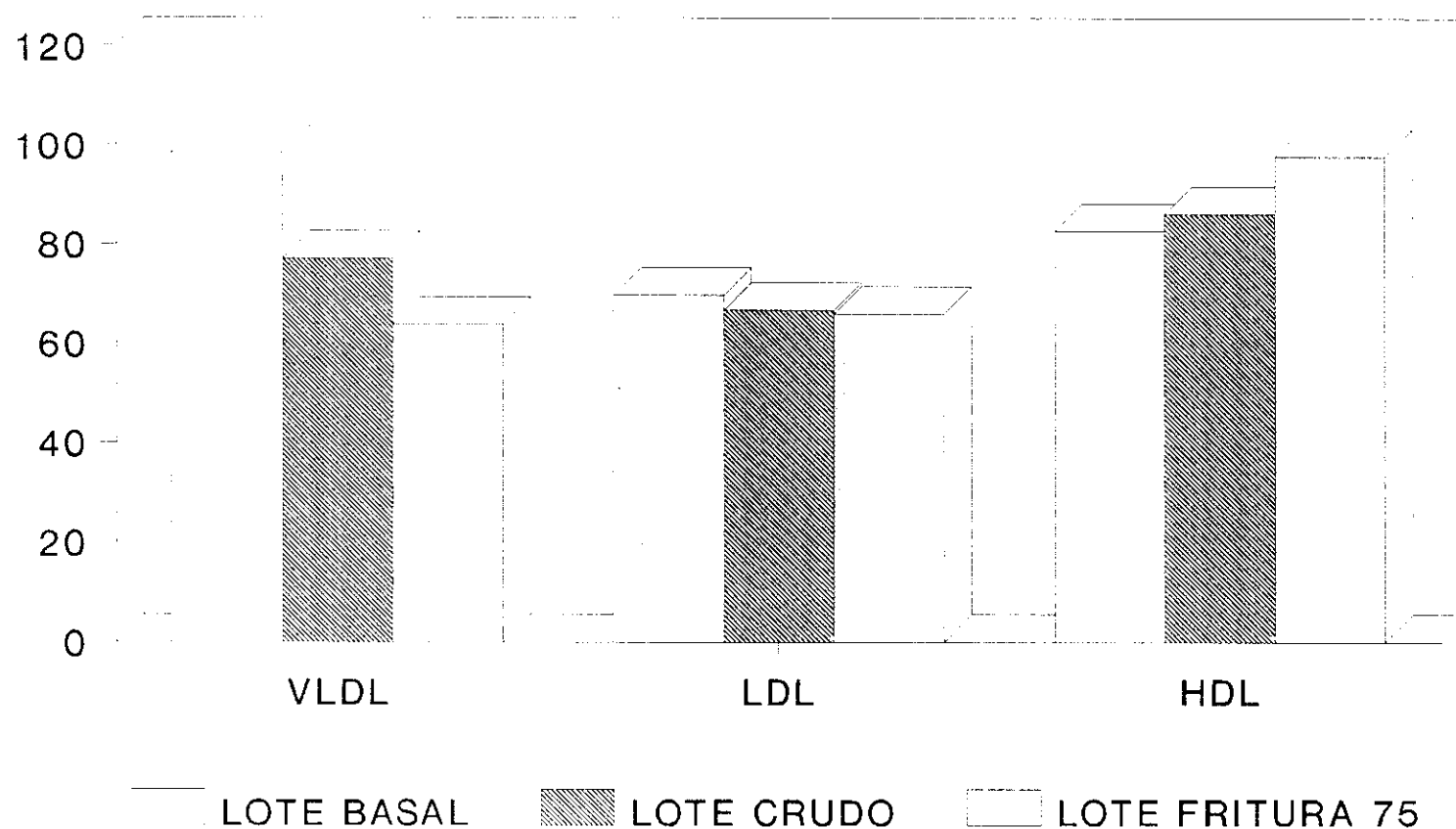
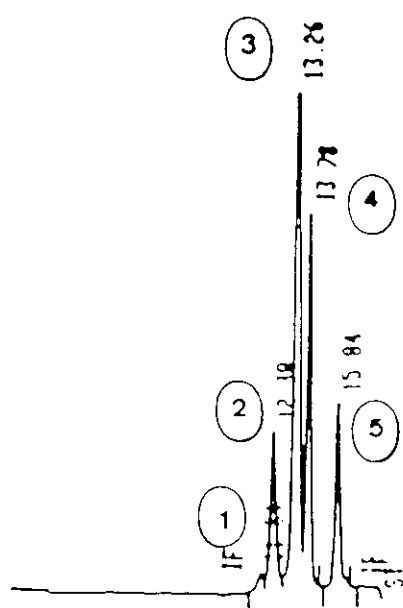
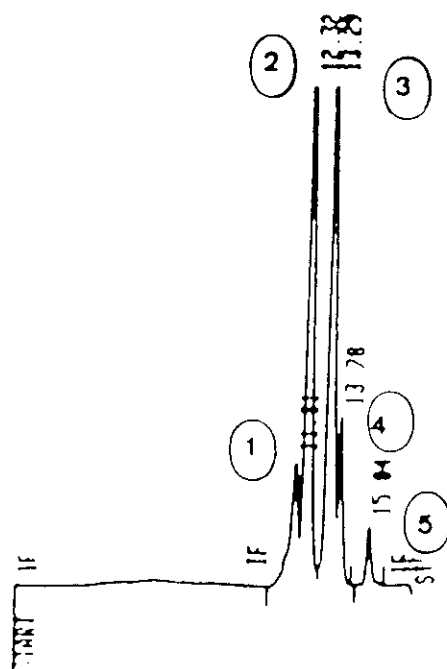


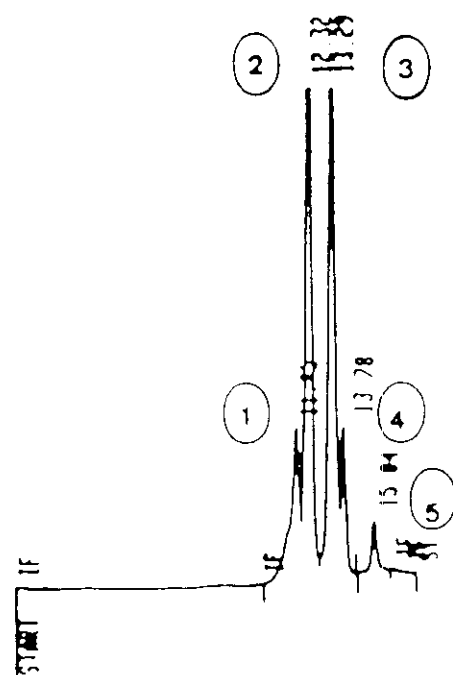
FIGURA Nº 6. CROMATOGRAMAS DE HPSEC.



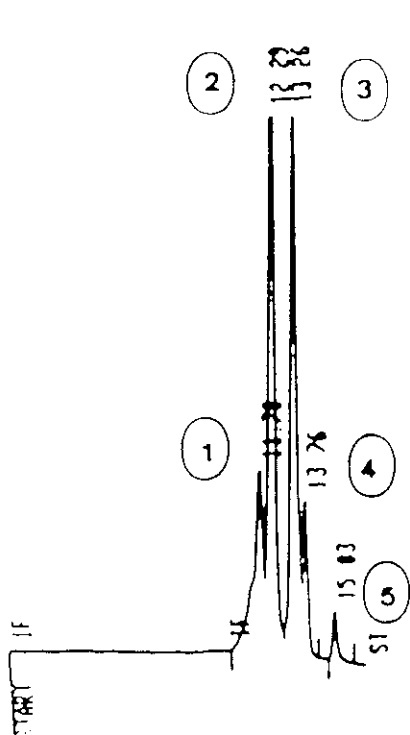
ACEITE CRUDO



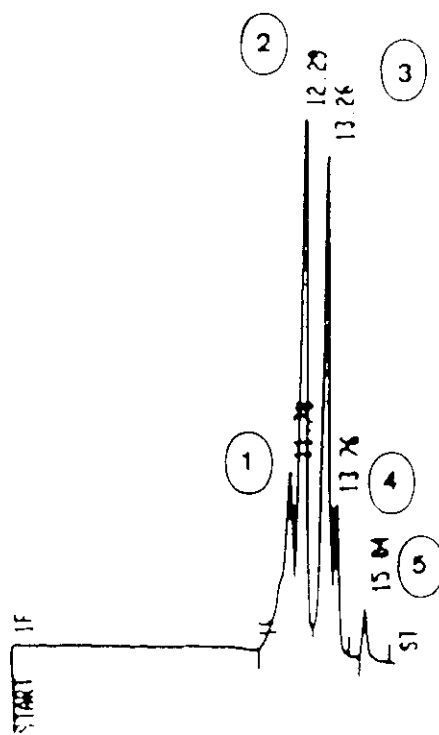
FRITURA 20



FRITURA 30



FRITURA 50



FRITURA 75

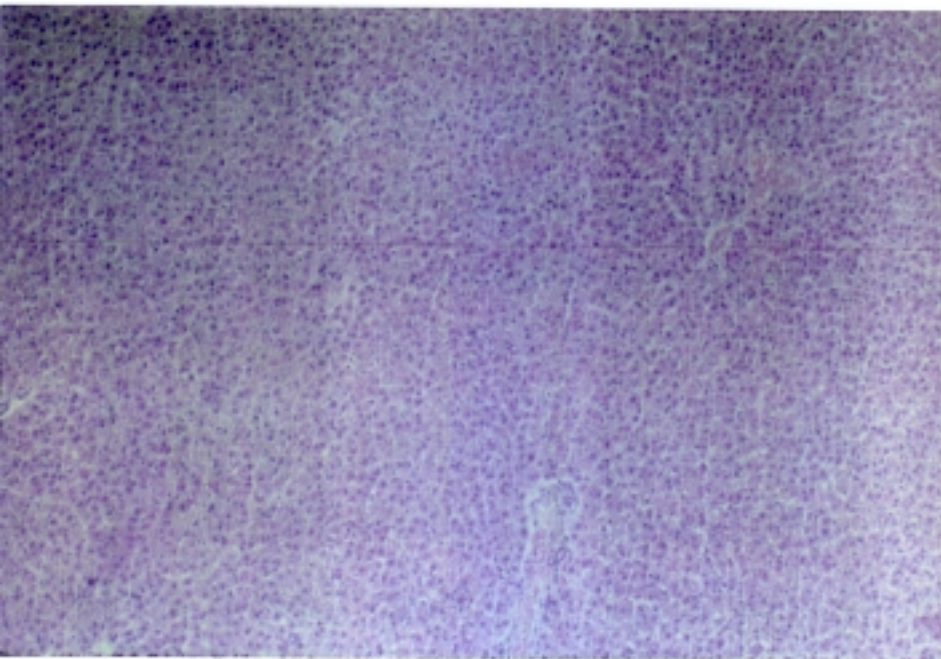


FIGURA 7.
LOTE BASAL.
TINCION HEMATOXILINA-EOSINA.
(X 20)

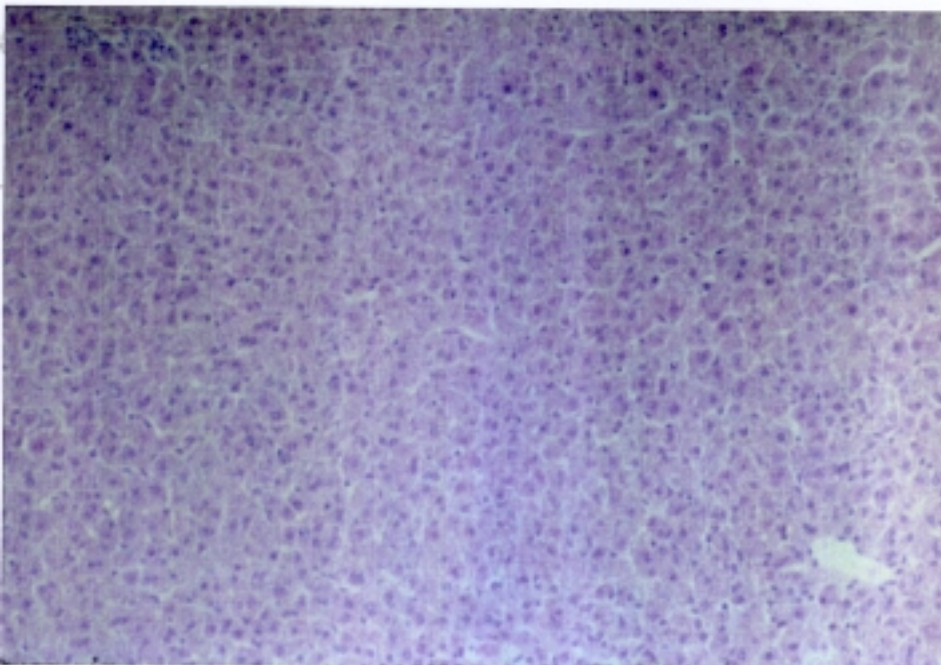


FIGURA 8.
LOTE BASAL.
TINCION HEMATOXILINA-EOSINA.
(X 40)

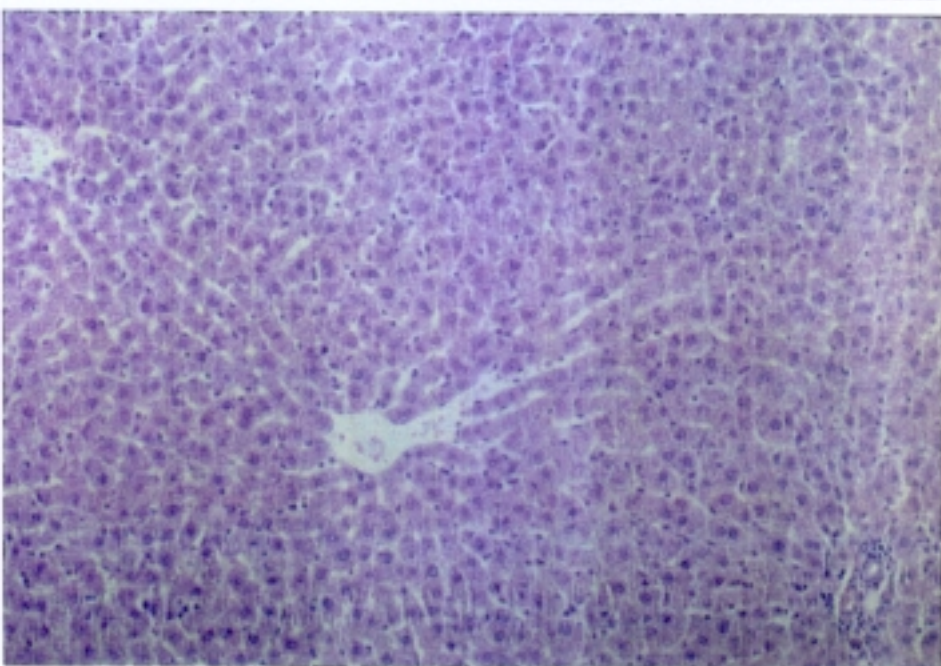


FIGURA 9.
LOTE BASAL.
TINCION HEMATOXILINA-EOSINA.
(X 40)

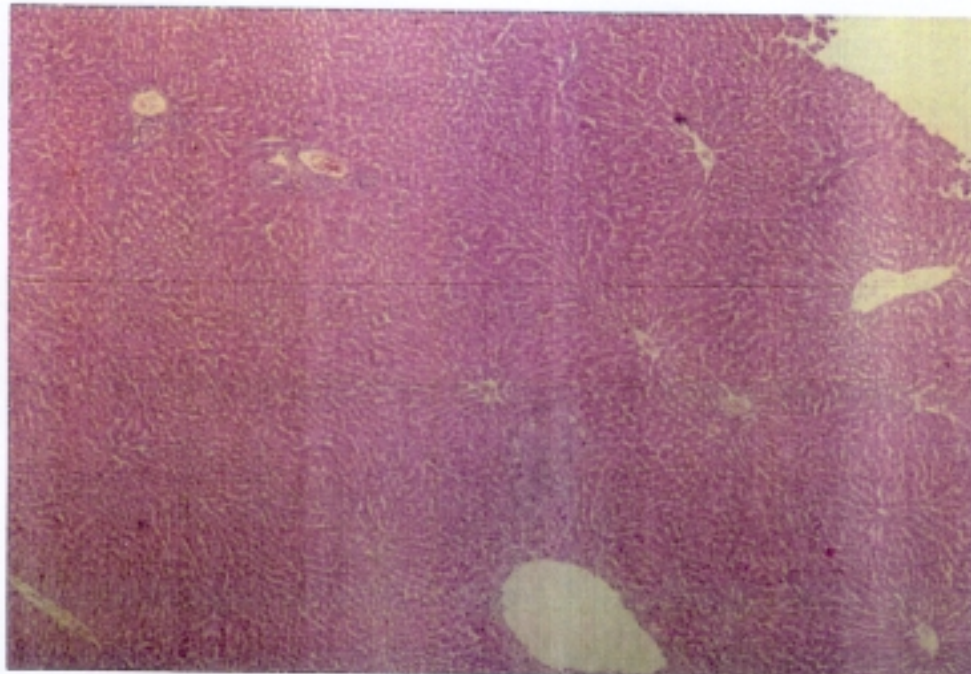


FIGURA 10.
LOTE CRUDO.
TINCION HEMATOXILINA-EOSINA
(X 20)

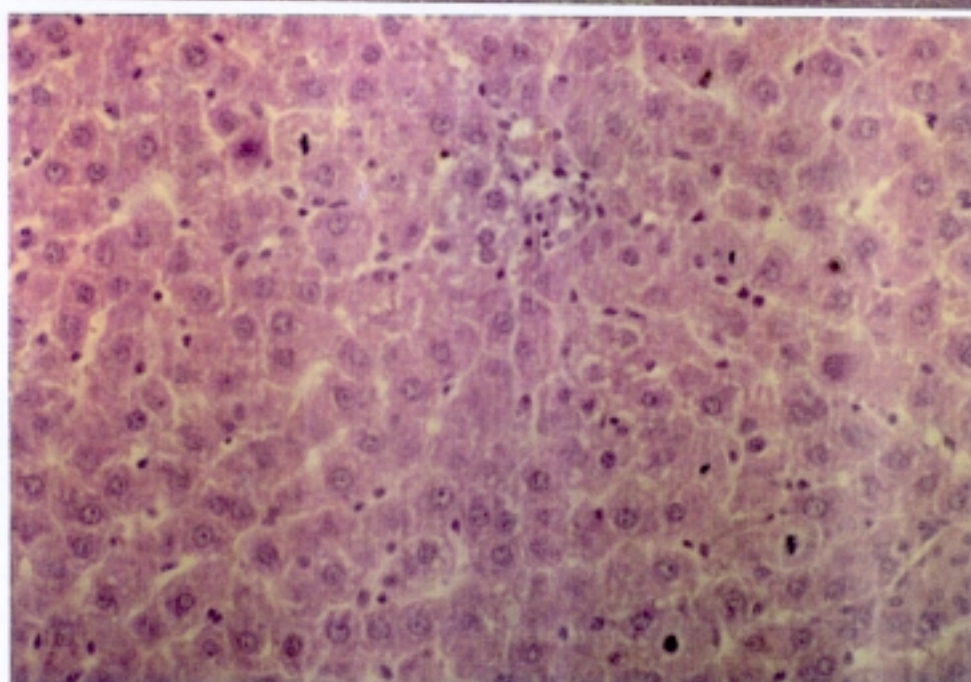


FIGURA 11.
LOTE CRUDO.
TINCION HEMATOXILINA-EOSINA
(X 100)

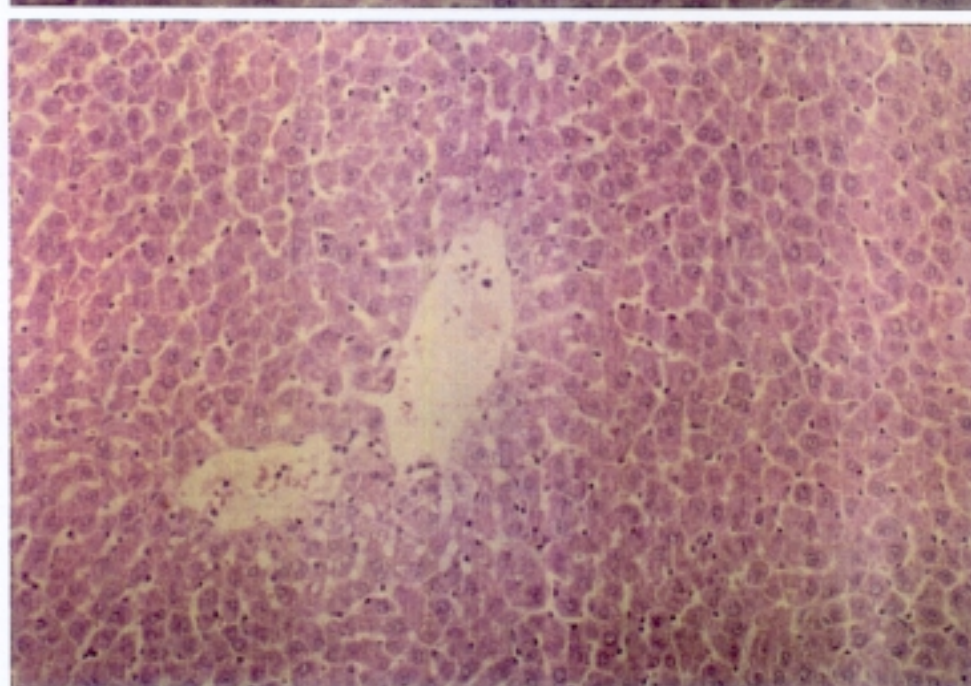


FIGURA 12.
LOTE CRUDO.
TINCION HEMATOXILINA-EOSINA
(X 40)

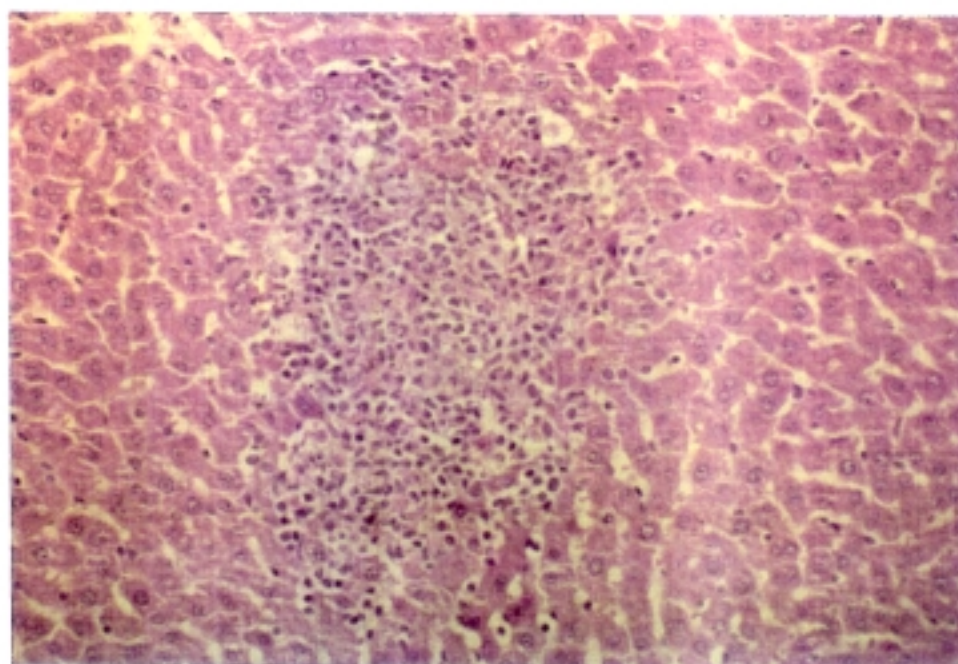


FIGURA 13.
LOTE CRUDO.
TINCION HEMATOXILINA-EOSINA.
(X 100)

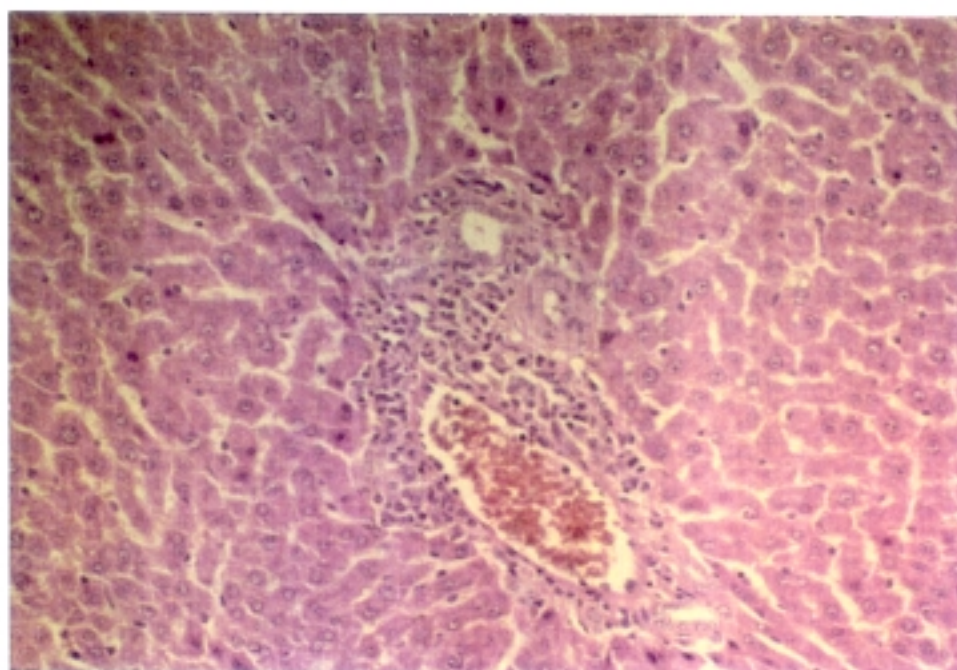


FIGURA 14.
LOTE CRUDO.
TINCION HEMATOXILINA-EOSINA.
(X 100)

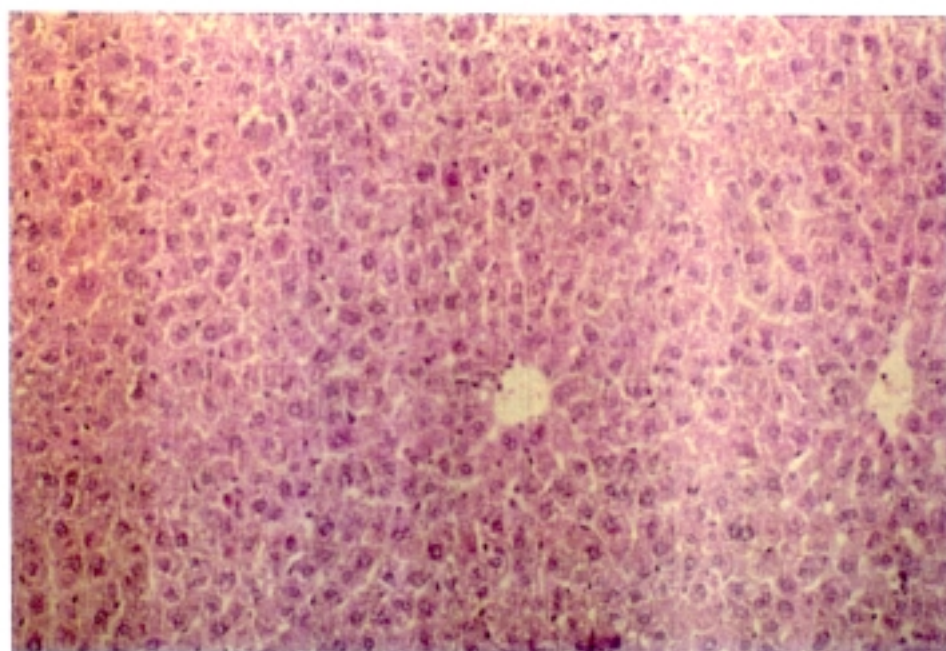


FIGURA 16.
LOTE FRITURA 75.
TINCION HEMATOXILINA-EOSINA
(X 100)

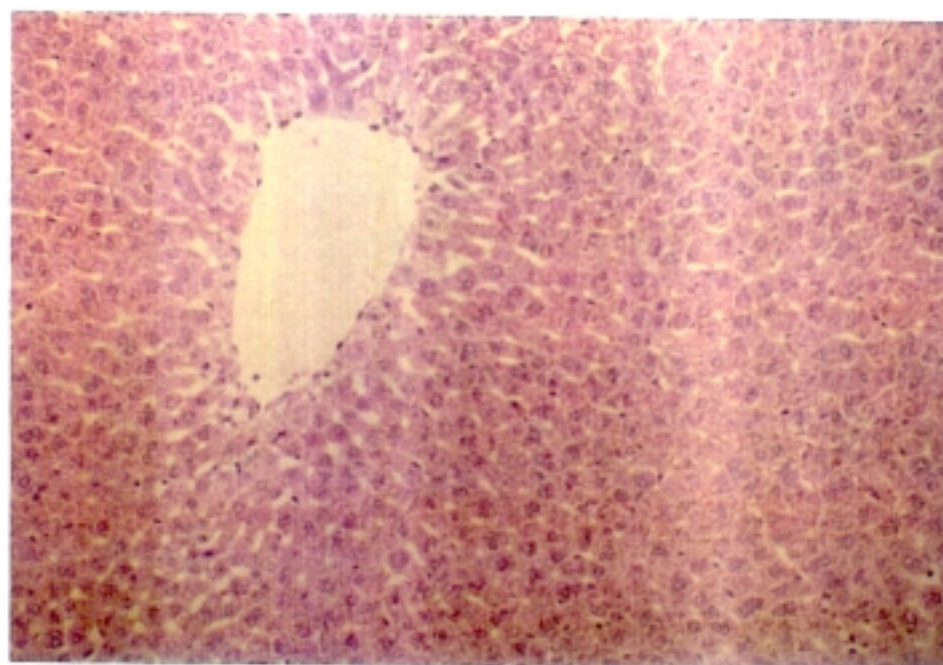


FIGURA 16.
LOTE FRITURA 75.
TINCION HEMATOXILINA-EOSINA.
(X 100)

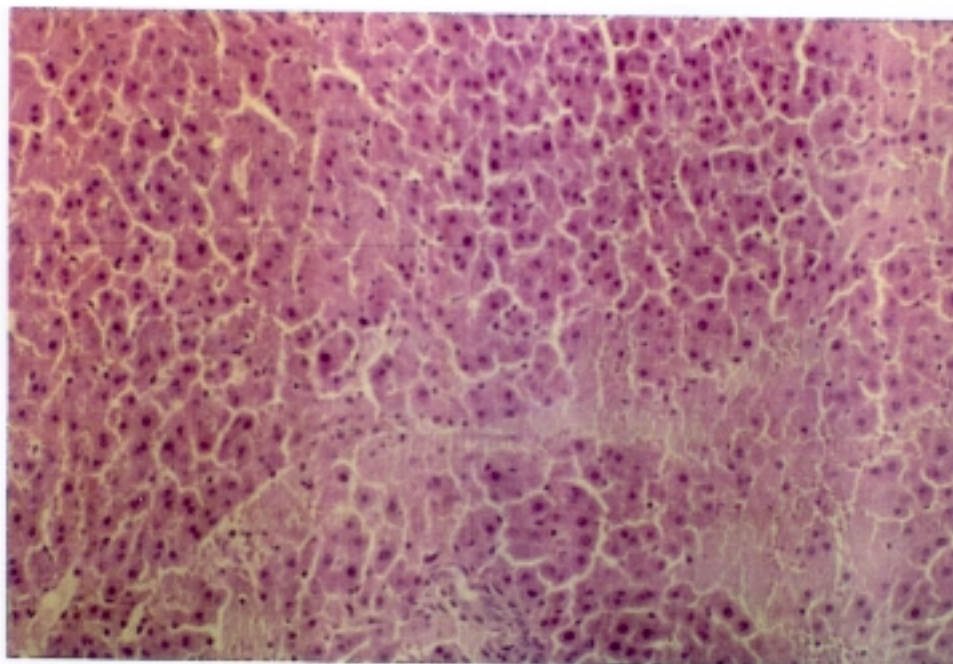


FIGURA 17.
LOTE FRITURA 75.
TINCION HEMATOXILINA-EOSINA.
(X 100)

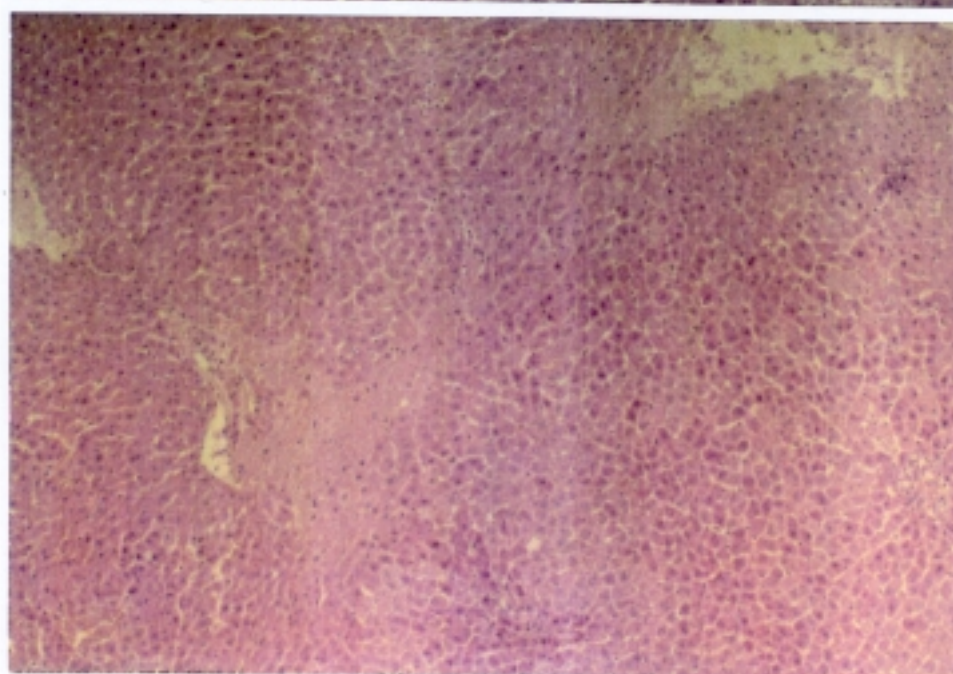


FIGURA 18.
LOTE FRITURA 75.
TINCION HEMATOXILINA-EOSINA.
(X 40)

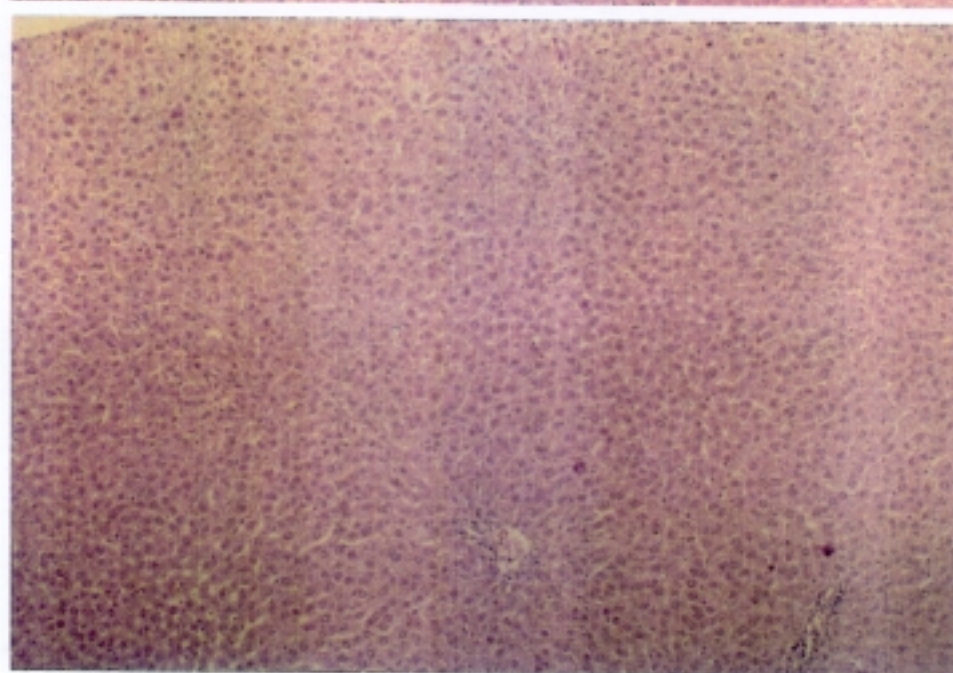


FIGURA 19.
LOTE FRITURA 75.
TINCION HEMATOXILINA-EOSINA.
(X 40)

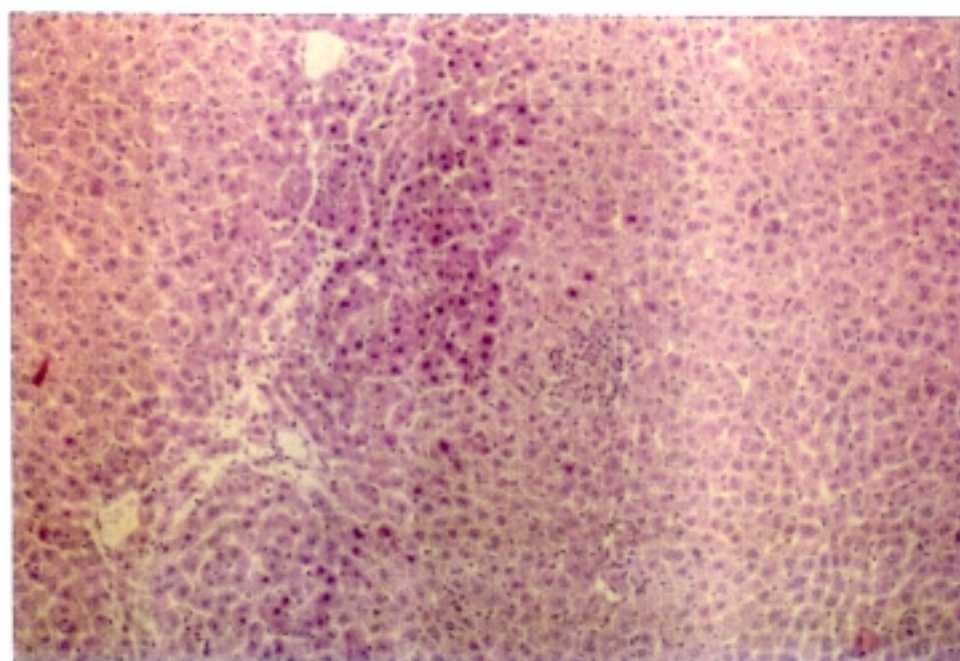


FIGURA 20.
LOTE CRUDO.
TINCION HEMATOXILINA-EOSINA
(X 100)

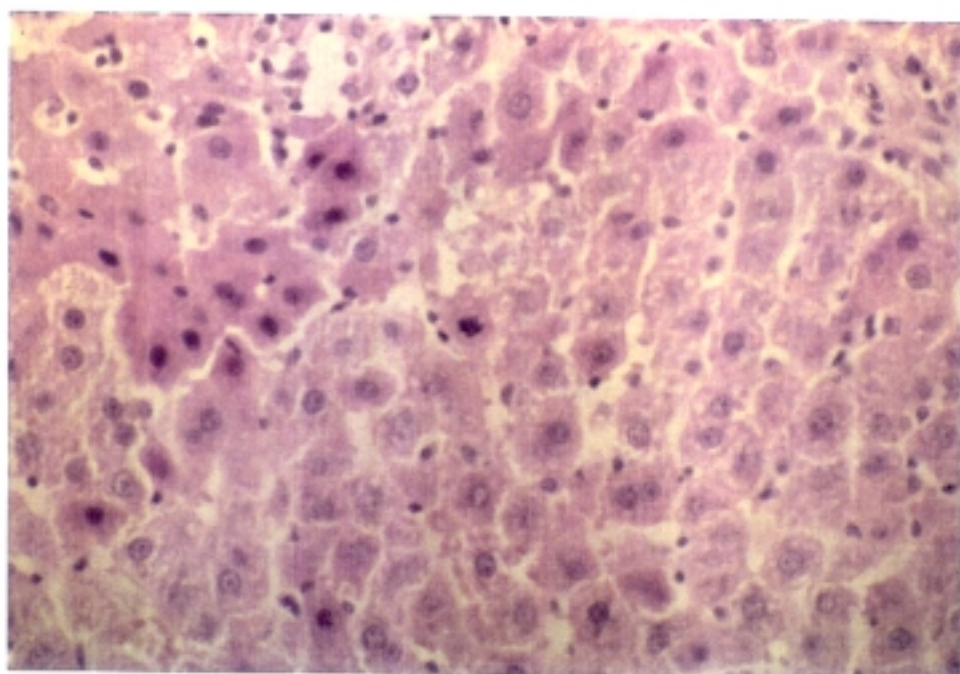


FIGURA 21.
LOTE CRUDO.
TINCION HEMATOXILINA-EOSINA
(X 250)

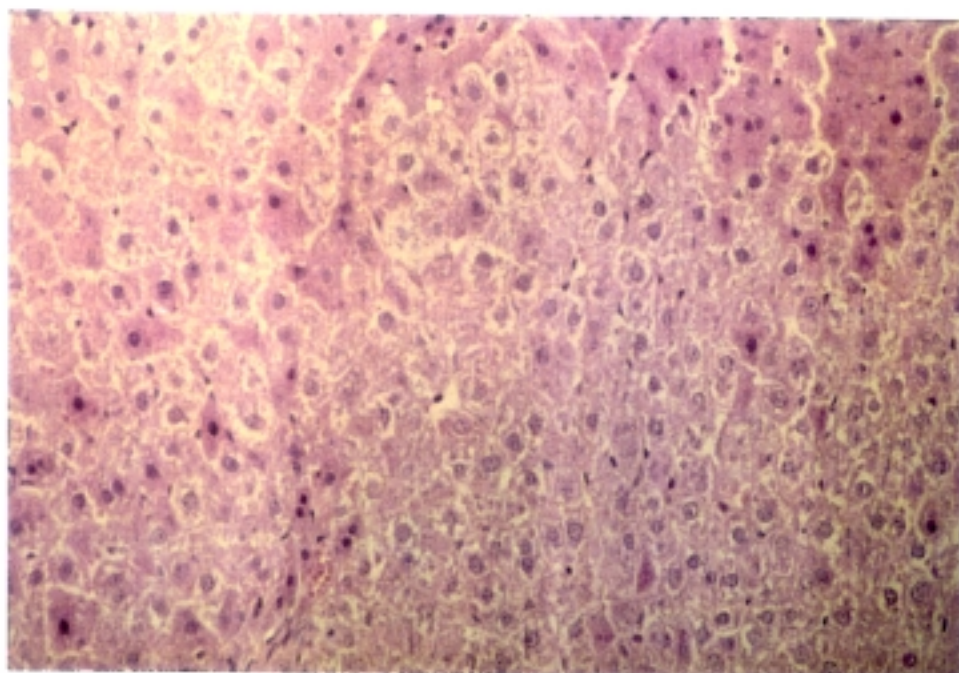


FIGURA 22.
LOTE FRITURA 75.
TINCION HEMATOXILINA-EOSINA
(X 100)

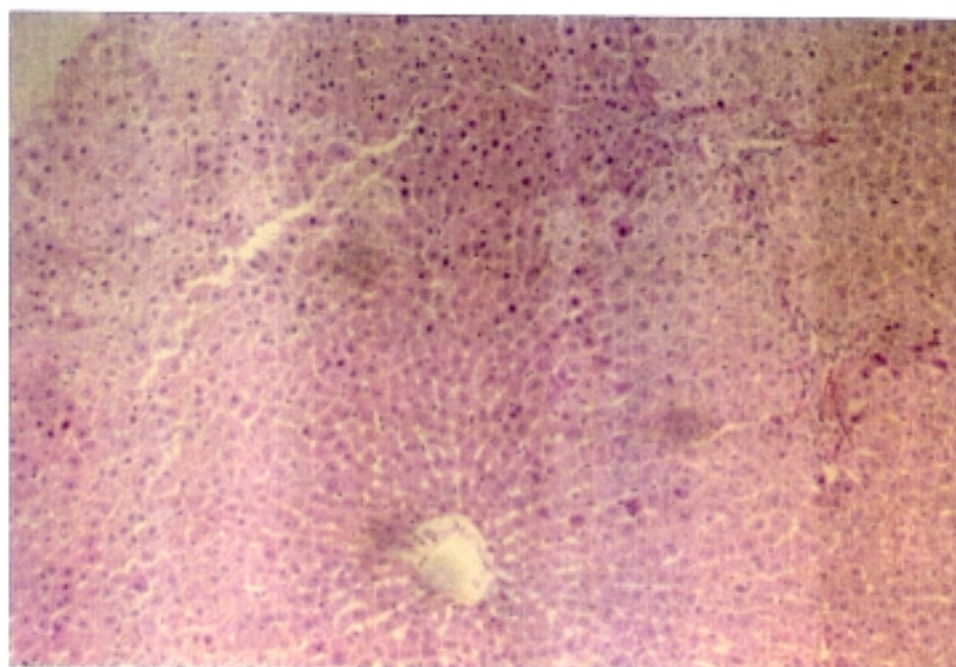


FIGURA 23.
LOTE FRITURA 75.
TINCION HEMATOXILINA-EOSINA.
(X 40)

5. DISCUSION DE RESULTADOS

5.1. VARIACIONES EN EL ACEITE DE FRITURA

5.1.1. Variaciones de la temperatura en el aceite del baño durante el proceso de fritura.

La evolución de la temperatura del aceite de girasol utilizado en 75 frituras sucesivas de patatas aparece esquematizada en la gráfica 1.

Es importante comentar que la fritura es un proceso dinámico donde la temperatura del baño de fritura varía debido a la adición del alimento y a los procesos de evaporación de agua y absorción de grasa.

El aceite del baño que inicialmente tiene una temperatura de 180°C , al añadir el alimento sufre un profundo descenso, estabilizándose durante el periodo de 2 a 5 minutos, para luego ir ascendiendo paulativamente. Esta evolución de la temperatura es muy semejante a la que señalan Hernández y col. (1989), Garrido-Polonio (1991) y Sánchez-Muniz y col. (1992a), friendo patatas en aceite de oliva y girasol respectivamente durante 15 frituras sucesivas de patatas.

En la tabla 1 se encuentran recogidos los valores medios y el error estándar de la temperatura, correspondientes a las frituras 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 75 a los minutos de fritura 1, 2, 5, 6 y 8.

La temperatura más baja alcanzada a los 2 minutos fue de $140 \pm 4,00^{\circ}\text{C}$, en la fritura 40 y la más elevada en la fritura 50, $151 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. La temperatura final varió entre $145,0 \pm 1,00^{\circ}\text{C}$ en la primera fritura y $160,0 \pm 4,00^{\circ}\text{C}$ en la fritura 50, por lo que la temperatura media del proceso fué aproximadamente 150°C .

Gere (1983a) observó que la descomposición del aceite se acelera al ir aumentando la temperatura y esta descomposición es máxima cuando la temperatura es superior a 200°C .

Fedeli (1988) en sus trabajos sobre fritura, describe que la velocidad de degradación de un aceite es proporcional a la temperatura de calentamiento y al tiempo que dura el proceso de fritura.

Blumenthal (1991), relaciona la temperatura del baño y la formación de surfactantes en el mismo, ya que durante la fritura se produce la formación de una finísima capa aislante sobre las resistencias, cuya formación depende del grado de alteración del aceite o grasa culinaria y en particular de la formación de

surfactante. Dicho surfactante carbonizaría sobre la superficie de las resistencias produciendo una capa aislante demandando al sistema controles térmicos más elevados por parte del termostato.

Hay que tener en cuenta, que la curva de temperatura en las primeras frituras es diferente de las últimas (gráfica 1) y esto es como consecuencia de la formación de una finísima capa aislante sobre las resistencias de las freidoras, demandando al sistema controles térmicos más elevados por parte del termostato. (Blumenthal, 1991).

Por otra parte, la formación de surfactantes en el baño de fritura ocasionan un aumento en el tiempo de contacto entre el alimento y el aceite. A su vez, las altas concentraciones de surfactantes aumentan el ritmo de descomposición del aceite. (Blumenthal, 1991).

5.1.2. Rendimiento

El rendimiento del aceite empleado en las frituras se ha evaluado en relación a 2 variables:

- 1) Pérdida de aceite del baño de fritura
- 2) Peso del alimento frito en relación con su peso en crudo.

5.1.2.1. Pérdida de volumen de aceite del baño de fritura

En la tabla 2 y gráfica 2, se indica que durante el proceso de fritura se produce una pérdida en volumen de aceite, que es más acusada de la 20 a la 40 fritura, $(375,00 \pm 28,9 \text{ ml})$ cada 10 frituras, a partir de la misma la pérdida en volumen por freidora es de algo más de 250 ml cada 10 frituras. Esto es debido, como ya se ha expuesto en la revisión bibliográfica, a una absorción del aceite de las freidoras por las patatas.

Estos resultados son similares a los encontrados por Varela y Sánchez-Muniz (1986), Arroyo y col. (1992) y Sánchez-Muniz y col. (1992a).

Hernández (1989), friendo patatas en aceite de oliva, encontró una pérdida de volumen de 225,35 ml por fritura y freidora, Garrido-Polonio (1991) utilizando un

diseño experimental equivalente, pero utilizando aceite de girasol obtuvo una pérdida de volumen de 243,01 ml por fritura y freidora, es decir un 7,85 % más elevado.

Hay que tener en cuenta que nosotros rellenamos las freidoras con aceite fresco cada 4 frituras hasta la fritura 20, donde el porcentaje de pérdida de aceite es aproximadamente de un 6%. A partir de la fritura 20 se completó el volumen cada 5 frituras hasta el final de la experiencia, el volumen de aceite perdido es mayor en la fritura 40 (12.5%), sufriendo a partir de la fritura 50 un descenso que se mantiene hasta la fritura 75, con un valor aproximado del 9%.

El volumen total de aceite fresco añadido a lo largo de toda la experiencia fue de 4,5 litros aproximadamente.

El tiempo que el aceite se calentó fue aproximadamente de 25 horas y 10 minutos.

5.1.2.2. Variaciones del peso del alimento frito en relación con el alimento crudo.

En la tabla 3, se reseña el peso de las patatas procedentes de las frituras 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 75, que osciló entre 194,75 y 210 g. No se aprecian diferencias significativas entre los pesos de las patatas procedentes de las diferentes frituras.

Teniendo en cuenta que en cada tanda se frieron 500 g de patatas, los datos señalan una pérdida del 60% de su peso, principalmente debido a la pérdida de agua, como señala Varela (1988) y Arroyo (1991).

Nuestros datos son similares a los encontrados por Figueroa (1984), Hernández (1989) y Garrido-Polonio (1991), friendo patatas en diferentes grasas culinarias, en las que el peso de las patatas tiende a incrementarse con el número de fritura.

Sánchez-Muniz y col. (1992a) estudiaron el volumen de aceite perdido y el peso de las patatas obtenido de la realización de 15 frituras sucesivas y discontinuas en aceite de girasol, encontrando que existía una mayor pérdida de aceite del baño de la freidora y un mayor peso de patatas conforme aumentaba el número de frituras.

Hay que tener en cuenta, que a medida que el aceite se va descomponiendo, se van formando surfactantes que producen un aumento en el tiempo de contacto entre el

alimento y el aceite. Esto hace que el alimento absorba aceite en exceso y que la tasa de transferencia de calor a la superficie del alimento aumente. Con el tiempo, la superficie del alimento se seca y oscurece, mientras que la conducción de calor hacia el interior se mantiene constante y no puede acelerarse por medio de cambios en el aceite (Blumenthal, 1991).

5.1.3. Variaciones en los índices analíticos de carácter general.

El calentamiento prolongado de aceites vegetales durante la fritura es un proceso relativamente enérgico, que altera las características físico-químicas de los mismos. En este apartado discutiremos los resultados obtenidos al utilizar los diferentes índices analíticos empleados para evaluar estos cambios.

5.1.3.1. Índice de Refracción

Las variaciones de este índice se producen a consecuencia de la formación de polímeros como señaló Permayer y Boatella (1977), y más recientemente Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes (1988).

En la Tabla 4 y en la gráfica 3, se indican los valores de índice de refracción del aceite de girasol inicial y de los aceites procedentes de las frituras 20, 30, 50 y 75. Todos ellos están dentro de lo que señala la Norma UNE 55-015 (1958), y el B.O.E. (Presidencia de Gobierno, 1983).

Analizando estadísticamente los resultados no se producen modificaciones significativas durante las 75 frituras sucesivas de patatas, aunque se observa que a partir de la fritura 20 y sucesivas, se produce un aumento a partir de la cuarta cifra decimal.

Varela y Col. (1983) indican, que en general el índice de refracción no se modifica cuando las condiciones experimentales son suaves.

Coll y Rueda (1984) encuentran muy pequeñas modificaciones de este índice en aceites de girasol, oliva y soja, durante 25 frituras de patatas a 170°C, datos que concuerdan con nuestros resultados.

Hernández (1989) y Cuesta y col. (1991b) encuentran sólo modificaciones en la 4ª cifra decimal de

este índice en un aceite de oliva utilizado en 15 frituras sucesivas de patatas.

Rodríguez y col. (1984) y Díaz Alonso (1977) en condiciones más drásticas de fritura de patatas, que las de este estudio, encontraron un incremento de casi una milésima en este índice.

Todos estos datos se refieren a aceites procedentes del baño de fritura pero no al aceite del interior de las patatas.

Arroyo (1991) estudiando las variaciones de los distintos índices analíticos del aceite de girasol extraído de patatas tras 15 frituras, obtuvo valores de este índice mayores a los obtenidos por distintos autores que analizaron dicho índice en el baño de fritura (Cuesta y col., 1991b, Garrido-Polonio, 1991 y Sánchez-Muniz y col., 1992a), sugiriendo que existe una menor alteración de la grasa del baño que la extraída de las patatas fritas.

Hay que tener en cuenta que si se ha agregado una cantidad apreciable de grasa de reemplazo, la medida del índice de refracción puede no ser tan útil (Jacobson, 1991).

5.1.3.2. Índice de Color

Las variaciones de este índice se producen a consecuencia de la formación de compuestos alfa y beta carbonilos insaturados (Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes, 1988), y formación de compuestos oxidados coloreados y de degradación de acrolenoides (Permayer y Boatella, 1977).

En la tabla 5 y gráfica 4 se muestran los valores del índice de color del aceite de girasol sin usar y el de los aceites procedentes de las frituras 20, 30, 50, y 75.

Según el Test de múltiple comparaciones Newman-Keuls se observa un incremento significativo del índice de color en la fritura 20 y sucesivas.

El-Zeany y Abdel Fattah (1982) y Pokorny (1980) encuentran también un oscurecimiento de los diferentes aceites sometidos a fritura.

Hemos de señalar que la coloración de las grasas se incrementa más rápidamente cuando se frie un alimento

como las patatas. Esto es debido a que los pigmentos del alimento se disuelven en la grasa de fritura (Fritsch, 1981).

Según Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes (1988), el índice de color representa mejor que otros índices analíticos basados en cambios generales químicos y físicos de las grasas, la alteración relacionada con la oxidación de los ácidos grasos y está influenciado por la acidez total.

5.1.3.3. Índice de Acidez

Según Permayer y col. (1985) y Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes (1988) las variaciones del índice de acidez indican las posibles alteraciones hidrolíticas que sufren los aceites.

En la tabla 6 y gráfica 5 se muestra la evolución de los valores del índice de acidez de aceite de girasol basal y de los aceites procedentes de las frituras 20, 30, 50 y 75. Todos ellos, a pesar de la alteración sufrida, están dentro de lo que señala la Norma UNE 55-011 (1964) y el B.O.E. (Presidencia del Gobierno, 1983).

Durante el proceso de fritura el índice de acidez aumenta de forma gradual, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las distintas etapas del proceso, y el valor inicial.

En esta experiencia el aceite de girasol tenía un valor de partida de $0,048 \pm 0,01$ y después de la fritura 75 de $0,463 \pm 0,03$ lo que supone un incremento muy elevado de la acidez libre. Garrido-Polonio (1991) observó que dicho índice experimentó modificaciones significativas respecto al valor del aceite de girasol basal a partir de la fritura 12.

La determinación de los ácidos grasos libres se ha indicado como uno de los mejores métodos para el control de la alteración de la grasa a lo largo del proceso de fritura (Morton y Chidley, 1988). No obstante hay una serie de factores que deben ser considerados cuando se usa este método.

El nivel de los ácidos grasos libres encontrado en la grasa culinaria no sólo refleja los ácidos que se forman durante el proceso de fritura sino también el nivel de ácidos grasos libres presente inicialmente en la grasa antes de calentar (Fritsch, 1981). Además los ácidos grasos libres se forman durante la fritura a

través de fenómenos oxidativos y de hidrólisis. La intensidad de estos procesos depende de diferentes variables incluyendo el tipo de grasas empleadas y el nivel inicial de ácidos grasos libres.

La determinación de ácidos grasos libres, no permite diferenciar qué cantidad de ellos provienen de la hidrólisis o de la peroxidación, si bien, se ha descrito que los productos de hidrólisis tienen poco efecto sobre la calidad de los productos fritos y además en la fritura generalmente esta alteración hidrolítica es pequeña (Fritsch, 1981, Stevenson y col., 1984). Estos mismos autores indican que este índice puede ser de utilidad para indicar cuando debe ser desechada la grasa de fritura.

5.1.3.4. Medida espectrofotométrica de la Absorción en UV a 270 nm (K270).

Hay que señalar que a esta longitud de onda, se absorben hidroperóxidos, dienos conjugados, trienos conjugados y productos secundarios de oxidación de forma inespecífica (Permayer y Boatella, 1977 y Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes, 1988).

En la tabla 7 y gráfica 6 se reseñan las modificaciones de la K270 del aceite de girasol no usado y las encontradas en dicho aceite después de ser utilizado.

En las diferentes frituras se observa que los valores del aceite inicial están dentro de los aceptados por el B.O.E. (Presidencia del Gobierno, 1983) para un aceite de girasol de buena calidad.

La absorbancia se incrementó en el aceite después de ser empleado en las distintas frituras, existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todas las frituras y la fritura basal.

Estos resultados indican la abundante formación de hidroperóxidos y dienos conjugados de compuestos carbonilos y trienos conjugados ya desde las primeras horas de frituras, datos que concuerdan con los de Permayer y col. (1985).

Según Gere (1984) la absorbancia a 232 nm indica la presencia de sistemas diénicos conjugados y de hidroperóxidos linoléicos.

Sanelli (1979) observa tras el calentamiento de aceite de oliva virgen, una variación en la K232 de 1,959 a 2,241 y en la K268 desde 0,147 hasta 0,660. Según este autor este aumento es debido a que, a consecuencia de la oxidación de la materia grasa, se forman hidroperóxidos que absorben a 270 nm aproximadamente.

Hernández y col. (1989) y Cuesta y col. (1991b), encontraron incrementos significativos para la K270 de un aceite de oliva sometido a 15 frituras de patatas, datos que concuerdan con los de esta experiencia. Sin embargo, Garrido Polonio (1991) y Sánchez-Muniz y col. (1992a), aunque observan una cierta tendencia al incremento en el aceite de girasol del baño de fritura, la modificación no fue significativa.

Arroyo (1991) estudiando el aceite de girasol extraído de patatas fritas encontró diferencias significativas en este índice analítico desde un valor inicial de $3,63 \pm 0,00$ hasta un valor de $7,57 \pm 0,77$ en la fritura 15.

Según White y Wang (1986) esta prueba de absorción a K270 es sumamente útil para medir el efecto que tiene el exceso de calentamiento sobre los aceites poliinsaturados, pero tiene una menor aplicación para aquellas grasas que tienen pocos ácidos grasos no saturados.

5.1.4. Métodos Analíticos basados en la evaluación de la alteración total.

5.1.4.1. Determinación cuantitativa de las fracciones alteradas y no alteradas de triglicéridos.

En las tablas 8 y 9 y en la gráfica 7, se presentan los porcentajes de triglicéridos no alterados y alterados obtenidos por cromatografía en columna del aceite de girasol a nivel basal y después de diferentes frituras de patatas.

La eficacia de esta separación se comprobó mediante cromatografía en capa fina en la que se diferenciaban claramente una mancha superior correspondiente a la fracción de triglicéridos no polares y otras de localización inferior a la de productos de alteración de triglicéridos.

La fracción de triglicéridos no polares del aceite de girasol basal representa el 94,91%.

Según Lumley (1988) el contenido de compuestos polares en un aceite no usado, debe oscilar entre 0,4% y 6,4% con lo cual el valor del aceite no usado obtenido en este estudio (5,09% : 4,10% de polares eluidos más 1,01% de polares retenidos), estaría pues dentro de estos límites y por lo tanto partimos de un aceite de girasol de aceptable calidad.

Como puede observarse en la tabla 9 la fracción polar del aceite de fritura, se eleva de forma drástica y significativa hasta la fritura 20, a partir de la cual, la alteración total del aceite se estabiliza obteniendo un valor final de 19,11% de alteración total, no alcanzandose por tanto el nivel máximo de compuestos polares admitido por la legislación (Dobarganes, 1989, Ministerio de Relaciones con las Cortes y de Secretaria del Gobierno, 1989; Blumenthal, 1991).

Por lo tanto con nuestros resultados podemos defender la hipótesis, que un turnover frecuente de aceite es beneficioso para mantener la calidad de un aceite de fritura.

En esta memoria se partió de un valor basal de alteración total de 5,09%, en la fritura 20 se alcanza un nivel de 15,99%, en la 30 de 17,99%, en la 50 de 18,92% y en la 75 de 19,11%.

Lógicamente en todas estas frituras existen diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al valor del aceite de partida.

Paralelamente al aumento de triglicéridos polares totales (los eluidos más los retenidos en columna) se produjo una disminución de los triglicéridos no polares, este descenso fué igualmente significativo ($p < 0,05$) ya que desde un valor inicial de 94,91% pasa en la fritura 20 a 84,48%, en la 30 a 82,00% en la 50 a 80,97% y finalmente en la 75 a 80,24%.

Estos resultados muestran claramente el incremento de la alteración, tanto de la fracción total eluida con éter etílico como de alteración total, hasta la fritura 30 tendiendo posteriormente a estabilizarse.

Cuesta y col. (1991a), Garrido Polonio (1991) y Arroyo (1991) señalan que el contenido de ambas fracciones (polar y no polar) de triglicéridos se modifican de forma prácticamente lineal con el número de frituras.

Según Fedeli (1988) la rápida formación de este componente polar es proporcional a la temperatura y tiempo de fritura.

Pérez-Camino y col. (1988b) encontraron que después de someter a un aceite de girasol a calentamiento durante 100 horas, la fracción de triglicéridos polares aumentó desde 1,8% a 61,8%. Estos datos indican que las frituras discontinuas son un proceso menos agresivo que el simple calentamiento del mismo durante 100 horas.

Smith y col. (1986) encuentra también muy buenas correlaciones entre los tiempos de fritura y los aumentos en la grasa de fritura de la constante dieléctrica, los compuestos polares totales y los ácidos grasos libres.

Diferentes investigadores, Fritsch (1981), Castellón (1989), Kyoko-Hara y Denshiro (1989), Ancín y Martines (1991), también señalaron que el índice más discriminativo, es decir el que mejor define la alteración de las grasas de fritura, es el componente polar.

Paradis y Nawar (1981a, 1981b) indican así mismo, que la cuantificación del componente polar total es un índice muy válido del deterioro de la grasa de fritura y propone un límite de un 27% de compuestos polares, sobrepasado el cual una grasa debe ser desechada.

Una reciente investigación (Arroyo y col., 1992) señala que durante la fritura de patatas con aceite de girasol, sin adición de aceite fresco, se produce un continuo aumento de la fracción polar hasta un valor de 27,3% en la fritura 60. Esto contrasta con nuestros resultados. Esta comparación es relevante porque la mayor parte de los debates surgen entorno a la frecuencia con que se debe añadir aceite nuevo y al deterioro que sufren las grasas de fritura.

En consecuencia, un frecuente turnover con aceite fresco es positivo, ya que la alteración de la grasa es menor y el nivel de polares que dicta la legislación raramente se alcanza.

5.1.4.2. Variaciones de las fracciones no polar y polar de ésteres metílicos.

Los resultados obtenidos están reseñados en la tabla 10 y presentan las variaciones de la fracción no alterada o no polar y de las fracciones alteradas (polares eluidos con eter etílico y retenidos por la columna).

Como ya se ha señalado en la revisión bibliográfica y en el apartado de Material y Métodos, se han realizado estas determinaciones, además de las anteriormente citadas de triglicéridos polares, por considerar que la obtención previa de ésteres metílicos obvia aspectos negativos del último método citado (Dobarganes y col., 1984; Hernández y col., 1989)

La fracción no polar disminuye desde un valor inicial para el aceite basal de 98,33% hasta un 93,84% en la fritura 75, encontrándose diferencias significativas entre estos valores ($p < 0,05$).

Consecuentemente la fracción alterada total va en aumento desde un 2,07% para el aceite basal hasta un 5,96% en la fritura número 75, presentando diferencias significativas entre ambas frituras.

Estos datos no concuerdan con los obtenidos por Garrido -Polonio (1991) al freír aceite de girasol durante 15 frituras sucesivas y Arroyo (1991) en el aceite extraído de patatas fritas, fritas en girasol, ya que únicamente encontraron diferencias significativas en la fracción polar.

Dobarganes y col. (1984) obtuvieron en un aceite de girasol refinado tras 100 horas de calentamiento un porcentaje de ésteres metílicos de triglicéridos no polares de 61,8% y un 36,3% de ésteres metílicos de compuestos polares, siendo la fracción retenida en columna de 1,9%.

Según Dobarganes y col. (1984) el porcentaje de alteración depende de la cantidad de ácidos grasos insaturados y más directamente del grado de insaturación de la grasa, así como del tratamiento térmico de la misma.

La fracción retenida en columna de sílice muestra diferencias significativas entre el dato obtenido del aceite basal y el contenido en la fritura 75, lo que también estaría relacionado con el incremento de degradación del aceite como indican Dobarganes y col. (1984), y Cuesta y col. (1991a).

5.1.4.3. Determinación del contenido relativo y absoluto de ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante Cromatografía Gaseosa.

La composición química de los ácidos grasos mayoritarios del componente graso de las dietas experimentales, se muestran en la tabla 11 y gráficas 8 y 9.

La composición química porcentual de los ácidos grasos mayoritarios de la dieta estándar de laboratorio, utilizada como referencia, indica la mezcla de oleaginosas en su componente graso debido a la gran proporción de ácido linoléico ($52,18 \pm 0,00\%$); linolénico ($3,13 \pm 0,01\%$); ácidos saturados ($15,74 \pm 0,01\%$) y su contenido en ácido oléico ($25,66 \pm 0,01\%$).

En la tabla 12 y gráficas 10 y 11 se reseñan la composición química de los ácidos grasos de los aceites procedentes de las frituras 20, 30, 50 y 75 respecto a este aceite sin utilizar.

El aceite de girasol sin usar presentó un elevado contenido en ácidos grasos insaturados, ácido linoléico ($55,52 \pm 0,05\%$) y en menor proporción ácido oléico ($32,43 \pm 0,09\%$), siendo su contenido en ácidos grasos saturados de ($6,76 \pm 0,15\%$) en ácido palmítico y ($3,79 \pm 0,09\%$) en esteárico. Estas cantidades son las habituales de un aceite de girasol de buena calidad, y coinciden con lo indicado por Coll y Rueda (1984) y Sánchez-Muniz y col. (1990a, 1992a), que describen similares cantidades de ácidos grasos en aceites de girasol.

Comparando el porcentaje de ácidos grasos del aceite de girasol crudo, con el componente graso de la dieta estándar de referencia, vemos que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de todos los ácidos grasos: saturados ($27,16 \pm 0,01$ vs $33,31 \pm 0,05\%$), monoinsaturados ($27,16 \pm 0,01$ vs $33,31 \pm 0,05\%$) y poliinsaturados ($52,18 \pm 0,01$ vs $55,52 \pm 0,05\%$).

A medida que aumenta el número de frituras se observa un descenso porcentual significativo ($p < 0,05$) en el contenido de ácido linoléico desde un valor inicial (crudo) de $55,52 \pm 0,05\%$ hasta un valor de $43,20 \pm 0,23\%$ en la fritura 75. De igual forma el ácido palmítico disminuyó de forma significativa al final del proceso de fritura ($6,76 \pm 0,15$ vs $5,95 \pm 0,01\%$). Sin embargo, tanto el ácido oléico ($32,43 \pm 0,09$ vs $44,85 \pm 0,20\%$) como el ácido esteárico ($3,79 \pm 0,09$ vs $4,18 \pm 0,01\%$), aumentaron de forma significativa desde el inicio del proceso de fritura hasta el final de la misma. Esto

probablemente puede ser debido a la degradación que sufre el ácido linoléico. (Cuesta y col., 1991b; Sánchez-Muniz y col., 1992a).

Globalmente se puede decir que debido al proceso de fritura hay un descenso significativo del porcentaje de ácido linoléico independientemente del tipo de grasa culinaria que se trate. Además hay que tener en cuenta, que durante la fritura de patatas, tiene lugar en el aceite del baño modificaciones que dependen del proceso termoxidativo y de penetración selectiva de los diferentes ácidos grasos en las patatas. (Sánchez-Muniz y col. 1989).

Como se ha señalado en la sección Material y Métodos (3.2.1.3.2), la cuantificación porcentual de ácidos grasos se evaluó sólo en la fracción no polar, a fin de evitar la contaminación de la columna con productos de degradación del aceite.

En relación al índice de saturación, (suma de ácidos grasos insaturados/suma de ácidos saturados), tabla 11, se observó que el componente graso de la dieta estándar de referencia, posee un índice de saturación mucho menor respecto a las otras dos dietas experimentales, y por el efecto de la fritura este índice aumenta de forma significativa ($8,35 \pm 0,04$ vs $8,70 \pm 0,02$).

Cuesta y col. (1991b) señalan que existe un incremento del porcentaje de ácidos grasos saturados en relación a los insaturados en los aceites sometidos al proceso de fritura.

Así mismo, Thomson y Aust (1983) encontraron que después de 100 horas de fritura un aceite de fritura sumamente hidrogenado perdió un total de 50% de sus ácidos linoléico y linolénico, por ende, la cantidad relativa de ácidos grasos saturados aumentó.

Paralelamente, Miller y White (1988) también informaron que la cantidad de ácidos linoléico y linolénico disminuyó y la cantidad relativa de ácidos grasos saturados aumentó en aceites de soja calentados a 180°C durante 40 horas.

En contraposición a nuestros datos Figueroa (1984); Hernández (1989) y Cuesta y col. (1991b) utilizando grasa de fritura aceite de oliva y sin turnover de aceite fresco, encontraron que tanto el ácido linoléico como el ácido oléico disminuían.

Garrido-Polonio (1991) utilizando como grasa de fritura aceite de girasol no encontró variaciones significativas del ácido oléico ni de los ácidos grasos

saturados y sin embargo encontró una disminución significativa del ácido linoléico.

Arroyo (1991) y Sánchez-Muniz y col. (1992a) al estudiar la composición porcentual del aceite extraído de las patatas fritas en girasol respecto al aceite de girasol basal encontraron un descenso significativo del ácido linoléico desde las primeras frituras, repercutiendo en el porcentaje del resto de ácidos grasos, produciéndose incrementos significativos en el ácido esteárico y oléico fundamentalmente.

Como se ha comentado en Material y Métodos (3.2.1.3.2), y aparece en la tabla 12, se puede calcular el contenido en mg/100mg de aceite de los ácidos grasos teniendo en cuenta el porcentaje de ésteres metílicos no alterados.

En la tabla 13 observamos que la concentración del ácido linoléico en mg/100mg de aceite disminuye significativamente ($p < 0,05$) al cabo de 75 frituras de $54,59 \pm 0,00$ a $40,92 \pm 0,32$ lo que representa un 25%, y en contraposición el ácido oleico aumenta significativamente ($p < 0,05$) de $31,89 \pm 0,09$ a $42,09 \pm 0,18$ en la fritura 75.

Fedeli (1988) en frituras de patatas, señala que la variación afecta principalmente al ácido linoléico, lo cual se corresponde con nuestros resultados. Este mismo autor indica que los ácidos poliinsaturados son influenciados más profundamente por la presencia de almidón (el cual sería cedido al aceite, en el caso de este estudio por la patata), el cual parece tener un efecto catalizador produciendo alteraciones complejas.

Vigneron y col. (1973), Causeret y col. (1978) y Guillaumin y col. (1979) han descrito que las grasas sometidas a tratamiento térmico sufren modificaciones en los ácidos grasos con dos y tres dobles enlaces, lo que es la causa de la formación de compuestos polares de alto peso molecular. Así mismo Stevenson y col. (1984) indican que la degradación oxidativa está relacionada con el grado de insaturación de los ácidos grasos presentes en la grasa, así el ácido linolénico con tres dobles enlaces o el linoléico con dos, son mucho más susceptibles a este tipo de alteración que un ácido graso monoinsaturado.

Paralelamente, Gere y col. (1984) señalan que la estabilidad térmica de las materias grasas es función de su grado de insaturación y que los aceites que tienen alto contenido en ácidos grasos insaturados son los más degradables por el calor.

Por esta razón se ha prestado gran atención a la valoración de la estabilidad relativa de aceites como los de girasol y cacahuete. Farag y Hallabo (1977) han descrito que la estabilidad teórica de estos aceites se puede predecir de la composición de sus ácidos grasos, y se puede esperar que un aceite crudo de girasol, el cual contiene una alta concentración de ácido graso insaturado C18:2, debería ser muy susceptible a la oxidación, teniendo en cuenta que la vida útil de un aceite está inicialmente condicionada por su grado de insaturación basal.

Pérez-Camino y col. (1988a) indican que manteniendo similares las variables que inciden en el proceso de fritura, la composición de la grasa no sólo influye en el grado de alteración, sino en la composición de los productos originados y que la alteración de los ácidos grasos es superior siempre a la de un aceite de oliva.

Durante el proceso de fritura de patatas tiene lugar en el aceite del baño modificaciones que dependen de la propia forma de realizar la fritura, es decir si es de forma continua o discontinua y con turnover o no de aceite fresco.

En nuestro caso, como ya hemos indicado existe reposición con aceite nuevo para mantener constante la proporción alimento/volumen de aceite durante el proceso de fritura (discontinua), con lo cual el grado de alteración es mayor que si se hubiese realizado de forma continua, ya que durante los periodos de reposo del aceite hasta iniciar un nuevo ciclo de operaciones, continúan formándose polímeros en el aceite del baño de fritura. (Varela, 1984; Nawar, 1984; Gutiérrez-González-Quijano y Dobarganes, 1988; Arroyo y col., 1992).

Como ya se ha comentado la reposición con aceite fresco da lugar a que haya una aceptable renovación del aceite y se produzca una disminución en la alteración del mismo, obteniendo un aceite con una teórica mayor vida útil.

Sortirhos y col. (1986), analizando muestras de grasas utilizadas en la industria dedicada a la fritura de pollo, encuentran que los productos de oxidación de las grasas de fritura alcanzan un estado de equilibrio durante los 3 días de ser empleadas a causa de que la pérdida de aceite en las operaciones de fritura, era reemplazada diariamente con aceite fresco.

Pérez-Camino y col. (1988b) indican, así mismo, que el nivel de alteración de la grasa durante el proceso

de fritura en continuo es directamente proporcional a la temperatura y al tiempo en que se consume un volumen de grasa utilizada para la reposición.

De esta manera, según estos investigadores, el porcentaje de compuestos de alteración encontrados en distintas experiencias en freidoras industriales es muy inferior al recomendado para desechar las grasas y al obtenido en freidoras domésticas, ya que es práctica común en la industria efectuar la reposición con aceite fresco manteniéndose en la freidora el aceite utilizado. El aceite de la freidora no experimentaría una variación apreciable en todo el proceso controlado, no alcanzándose, por tanto, los valores límites para los porcentajes de acidez y compuestos polares.

Rojo y Perkins (1987) describen que los ácidos grasos con 18 átomos de carbono y dobles enlaces (C18:2 y C18:3) forman compuestos cíclicos los cuales están muy relacionados con la toxicidad de las grasas de fritura.

Por otra parte, es interesante destacar según opinan Sebedio y col. (1990) que los compuestos poliméricos tóxicos son diferentes cuando se forman a partir del ácido linolénico o linoléico.

5.1.4.4. Determinación de productos de alteración termo-oxidativa e hidrolítica.

El análisis del componente polar, como ya se ha indicado, informa sobre la alteración global de la grasa culinaria ó aceite de fritura. No obstante la investigación de los diferentes compuestos que forman esta fracción polar, es la que revela el tipo de alteración sufrida por el medio de fritura. Con la introducción de la técnica de HPSEC (Cromatografía de alta eficacia de exclusión por tamaño molecular) se han podido cuantificar los diferentes compuestos de alteración: polímeros y dímeros de triglicéridos, triglicéridos oxidados, diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres (Paradis y Nawar, 1981b; Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes, 1988; Christopoulou y Perkins, 1989).

Los cromatogramas obtenidos por HPSEC a partir de la fracción alterada total del aceite sin usar y de los utilizados en 20, 30, 50 y 75 frituras se muestran en la figura 6. En cada cromatograma aparecen una serie de picos correspondientes a las distintas fracciones obtenidas que son las siguientes: polímeros de triglicéridos (1), dímeros de triglicéridos (2), triglicéridos oxidados (3), diglicéridos (4) y ácidos

libres(5). Así mismo en la tabla 14 y gráficas 13 y 14 se muestra los distintos compuestos formados por la alteración hidrolítica (diglicéridos y ácidos grasos libres) y termoxidativa (polímeros de triglicéridos, dímeros de triglicéridos y triglicéridos oxidados) en las distintas etapas del estudio.

La cuantificación de estos productos está referida al total del componente polar (tabla 14 y gráfica 13) observándose un aumento lineal de los niveles de polímeros de triglicéridos hasta la fritura 50, ($0,10 \pm 0,01$ mg/100 mg fracción polar vs $3,15 \pm 0,20$ mg/100 mg fracción polar).

Sin embargo los triglicéridos oxidados no sufren modificación a partir de la fritura 20 y los dímeros de triglicéridos aumentan rápidamente durante las 30 primeras frituras ($0,75 \pm 0,12$ mg/100 mg de aceite vs $7,09 \pm 0,30$ mg/100 mg de aceite), pero permanecen en niveles casi constantes hasta el final de la experiencia.

Esto puede ser debido a que se produce de forma más fácil la polimerización de los triglicéridos. Estos compuestos de alto peso molecular son el resultado de la oxidación térmica típica de las grasas de fritura, contribuyendo no sólo a posteriores degradaciones en el medio de fritura, sino también a que sean absorbidos por el alimento frito y tomadas por el consumidor con las consecuencias tóxicas y efectos deletereos descritos en el apartado 1.7.1..

Ya que los productos más abundantes de la oxidación térmica en las grasas de fritura son los compuestos polimerizados (Kyoko-Hara y Denshiro, 1989), se ha sugerido que precisamente la determinación de polímeros es el mejor método para evaluar la calidad de tales grasas (Combe y col., 1981; Yashida y Alexander, 1983; Nawar, 1984; White y Wang., 1986).

Dentro de los productos alterados, la cuantificación de dímeros parece ser de un gran interés debido a su toxicidad (Kuprancycz y col. 1986; Kyoko Hara y Denshiro, 1989). Kuprancycz y col. (1986), encontraron que el aceite de girasol después de 8 y 16 horas de oxidación térmica contenía sustancialmente cantidades más elevadas de dímeros de triglicéridos y polímeros de triglicéridos que el mismo aceite sin usar. Estos autores indican también que durante las primeras 8 horas de calentamiento se forman mayor cantidad de dímeros de triglicéridos que de oligómeros complejos de más alto peso molecular, mientras que durante las 8-16 horas de calentamiento las cantidades de dímeros descendían y aumentaban los polímeros hasta alcanzar un nivel estable.

Nuestros resultados están de acuerdo con Kuprancyz y col. (1986) aunque los niveles de los triglicéridos dímeros tienden a estabilizarse mientras que los polímeros de triglicéridos aumentan linealmente a lo largo de las distintas frituras, por lo que existe una tendencia a la formación de estos últimos compuestos en el proceso de fritura.

White y Wang (1986) utilizando aceites de soja calentados hasta 56 horas a $182 \pm 2^\circ\text{C}$, encuentran que los dímeros de triglicéridos se incrementan hasta las 35 horas de calentamiento y luego descienden. Según ellos, este modelo representa un estado casi mantenido en la formación de dímeros y luego una formación mucho mayor de compuestos polimerizados.

Perrin y col. (1985) al analizar muestras de aceite de girasol oxidado, procedentes de frituras en las que ya se observaba formación de espuma, encontraron más concentraciones de dímeros de 12,1% y 12,9% en las muestras oxidadas.

Gere (1984) también describe la presencia de dímeros de triglicéridos en un aceite de girasol usado en frituras.

Rojo y Perkins (1987) encuentran una gran acumulación de ácidos grasos cíclicos monoméricos en aceite de soja calentado de forma intermitente durante 8 horas (8h/día) simulando un proceso de fritura. Perkins y Pinter (1988) llevaron a cabo estudios en los compuestos oxidados formados en grasas alteradas midiendo los niveles de estos compuestos mediante las técnicas de cromatografía de exclusión molecular (HPLC) y cromatografía gaseosa-espectrofotometría de masas (GC-MS). Los picos obtenidos mediante el método de HPLC representó una mezcla compleja de compuestos que sirvieron para evaluar la calidad de las grasas utilizadas frente a grasas sin usar y así indicar el grado de alteración de las grasas usadas. Las muestras utilizadas en cromatografía gaseosa-espectrofotometría de masas (GC-MS) mostraron picos, que al ser identificados, se vió que eran derivados del ácido esteárico.

Arroyo (1991) estudiando la fracción alterada de un aceite de girasol crudo y extraído de patatas fritas mediante HPSEC encontró un aumento significativo del contenido en polímeros y dímeros de triglicéridos que aumentaban 7,6 y 2,5 veces respectivamente, desde el aceite basal hasta el extraído de patatas procedentes de la fritura 15, por el contrario el contenido en triglicéridos oxidados, diglicéridos y ácidos grasos libres disminuyó significativamente 1,5, 3,1 y 3,6 veces en el aceite extraído de patatas de la fritura 15 en

aceite de girasol, respecto el aceite basal.

Sánchez-Muniz y col. (1992b) en un estudio analizando los aceites de girasol del baño de fritura, obtuvieron resultados similares a los anteriores observando un aumento en el contenido de polímeros y dímeros de triglicéridos y un descenso de triglicéridos oxidados, diglicéridos y ácidos grasos libres desde el valor del aceite basal hasta el final del proceso de fritura.

Merece un comentario, la presencia de estos compuestos en las grasas de fritura, ya que si bien como ya se ha indicado, los compuestos polímeros son tóxicos; investigadores como Permayer y Boatella (1977) indican que la toxicidad de los aceites calentados se debería atribuir esencialmente a los monómeros cíclicos, ya que se absorben más fácilmente que los compuestos polímeros de alto peso molecular, a los cuales, por otra parte, habría que atribuir la menor absorción de estos aceites calentados con una merma considerable del aporte de vitaminas liposolubles.

Rojo y Perkins (1987) describen así mismo, que los compuestos cíclicos monoméricos originados en la ciclación de los ácidos grasos poliinsaturados (C18:2 y C18:3), son los que están más relacionados con los aspectos nutricionales, ya que se absorben más fácilmente por el aparato digestivo y linfa que los compuestos dímeros o polímeros.

Hasta ahora se han descrito los compuestos que se originan por la alteración termoxidativa sufridas por las grasas de fritura. En estas se originan también una alteración hidrolítica, debida al agua que contienen los alimentos, que actúa como catalizador de las reacciones (Fedeli, 1988) y que por tanto debería manifestarse con cierta entidad cuando el alimento a freír, como sucede en esta experiencia, son patatas.

Los compuestos más característicos de la alteración hidrolítica son los diglicéridos y ácidos grasos libres, tal como describen Dobarganes y col. (1988). La cuantificación de los diglicéridos, y no la de los ácidos grasos libres, ya que estos últimos se pierden prácticamente durante la fritura, mostraría la intensidad de la contribución de la alteración hidrolítica al deterioro de la grasa o aceite de la freidora, ya que estos compuestos permanecen en la misma, mientras que los ácidos grasos se pierden parcialmente a lo largo del proceso de fritura.

Como se muestra en la tabla 15, la concentración de diglicéridos aumenta durante las primeras 20 frituras

($1,33 \pm 0,06$ mg/100 mg fracción polar respecto al aceite crudo basal ($1,11 \pm 0,17$ mg/100 mg fracción polar) , para después permanecer en un nivel prácticamente constante durante todo el proceso de fritura. Sin embargo los compuestos totales de la alteración hidrolítica sufren un incremento desde el valor basal hasta la fritura 30 (tabla 14, gráfica 14) estabilizándose hasta el final de la experiencia.

Los resultados obtenidos indican que al freir patatas en aceite de girasol un proceso termoxidativo tiene lugar en mayor grado que un proceso hidrolítico. Dobarganes y col. (1988), en un estudio realizado con diferentes aceites que tenían el mismo contenido de compuestos polares, llegaron a la conclusión de que en el aceite de girasol predomina la alteración térmica y oxidativa, mientras que en el aceite de oliva predomina la hidrolítica, lo cual influye en su vida útil, siendo más larga la del aceite de oliva.

En la tabla 16, se indican las relaciones entre los compuestos no polares y los distintos compuestos de alteración termoxidativa e hidrolítica del aceite de girasol crudo y procedente de las distintas frituras de patatas y las relaciones entre los distintos productos de alteración.

En resumen, la fritura discontinua de patatas en aceite de girasol a lo largo de 75 frituras con reposición del volumen de aceite perdido en la freidora con aceite no usado supone un incremento del contenido polar total en dicho aceite, hasta la fritura 20, tendiendo después a estabilizarse en un nivel constante de aproximadamente un 19%. Además se observa que paralelamente tiene lugar un proceso de degradación termoxidativo e hidrolítico, correlacionandose significativamente los polímeros de triglicéridos y diglicéridos con el número de frituras.

Por último, hemos de resaltar que si bien los compuestos polímeros tienen la importancia reseñada anteriormente por su incidencia en diferentes aspectos nutricionales y metabólicos al ser ingeridos, también son responsables de cambios físico-químicos en la grasa de fritura tales como color, espuma, incremento de la viscosidad, presencia del grupo carbonilo, formación de gomas, etc, los cuales repercuten no sólo en el aspecto desagradable del alimento frito, sino en su peor sabor y olor (Stevenson y col., 1984).

En nuestra experiencia, hemos demostrado que en frituras de patatas realizadas de forma repetida y discontinua con turnover frecuente no se alcanza el nivel crítico del 25% de compuestos polares y que los aceites

de fritura sufren por tanto una alteración y deterioro que puede considerarse de aceptable.

5.1.5. Correlaciones

La utilización de índices analíticos simples y rápidos como los empleados en este estudio, índice de color, refracción, absorción en UV y acidez libre, han sido descritos y criticados por varios autores, (Dobarganes y col., 1984 ; Pérez-Camino y col., 1988b). Estos investigadores objetan que estos índices, por un lado no indican la alteración específica (termoxidativa o hidrolítica) de la grasa de fritura, y por otro , como el propio aceite inicial posee en mayor o menor cuantía algunas de estas características físicoquímicas, es necesario conocer el valor inicial y que éste, esté dentro de los límites establecidos para una grasa de fritura de buena calidad.

No obstante, estos mismos autores, Pérez-Camino y col. (1988a) y Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes (1988) en trabajos posteriores, en el que evaluaron muestras procedentes de freidoras industriales y otras procedentes de freidoras domésticas, demuestran que los índices elegidos: acidez libre, punto de humo y prueba colorimétrica de Perevalov, se correlacionan bien con los glicéridos polares y ésteres metílicos polares y no polares, siendo por tanto aplicables cuando existen valores bien definidos para el aceite crudo, mientras que es necesario utilizar un método cromatográfico para la evaluación de muestras de historia desconocida.

Pérez-Camino y col. (1988b) indican que puede ser usado un índice simple para el control de la alteración de la grasa durante su uso, cuando se utilizan valores constantes de las variables implicadas en el proceso de fritura.

Cuesta y col. (1991b) indican que estos índices informan sobre la evolución de la alteración de un aceite de manera equivalente a sí se utilizará la valoración cromatográfica de ésteres metílicos alterados o de triglicéridos polares.

Ante las evidentes modificaciones tanto de los índices más rápidos y simples (refracción, color, absorción en UV y acidez libre), como los métodos más específicos (porcentaje de triglicéridos no polares y polares y porcentaje de ésteres metílicos alterados y no alterados) ya discutidos, parecía interesante estudiar las correlaciones existentes entre ambos grupos de métodos.

En las tablas 17 y 18 se refleja que:

- El índice de color presentó correlación significativa ($p < 0,01$) con el índice de refracción ($r = 0,9363$), acidez ($r = 0,8979$) y con la K270 ($r = 0,8139$). Paralelamente este índice presentó correlación elevada con el número de frituras ($r = 0,9704$; $p < 0,01$).

Cuesta y col. (1991b) encontraron también, una buena correlación del índice de color con el número de frituras al estudiar 15 frituras sucesivas y discontinuas de patatas en aceite de oliva ($r = 0,942$ $p < 0,01$), sugiriendo que puede ser un parámetro válido para estudiar la alteración de una grasa de fritura, siempre que se conozca el valor basal de dicho índice en el aceite objeto de estudio.

En un estudio paralelo con aceite de girasol, Garrido-Polonio (1991) encontró correlación elevada de este índice con el número de frituras ($r = 0,933$ $p < 0,01$).

- El índice de color presentó una correlación menor con los compuestos polares ($r = 0,7999$; $p < 0,05$) que con los distintos índices analíticos de carácter general dos ($r = -0,8307$ $p < 0,01$), sin embargo existe una correlación negativa elevada con los triglicéridos no alterados ($r = -0,8307$ $p < 0,01$).

- El índice de acidez presentó correlación fuerte y positiva tanto con el número de frituras ($r = 0,9675$; $p < 0,01$) como con los triglicéridos no polares ($r = 0,9206$ $p < 0,01$) y compuestos polares ($r = 0,9088$; $p < 0,01$). Así mismo, presentó correlaciones elevadas con el resto de los índices de carácter general (color, refracción y K270).

Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes (1988) demostraron que el índice de acidez está relacionado de forma directa con la oxidación de los ácidos grasos.

- La K270 tuvo una buena correlación con los índices de acidez y color ($r = 0,9183$, $r = 0,8139$; $p < 0,01$ respectivamente) y en menor proporción con el índice de refracción ($r = 0,604$ $p < 0,05$). Paralelamente dicho índice presentó correlación elevada con los triglicéridos no polares ($r = 0,8604$ $p < 0,01$) y con el número de frituras ($r = 0,8945$; $p < 0,01$).

Garrido-Polonio (1991) en el aceite de girasol del baño de fritura y Cuesta y col. (1991b) en aceite de oliva de la freidora, no encontraron correlaciones significativas entre la absorción UV a 270 nm y el número de frituras; sin embargo Arroyo (1991) en su estudio con

aceite de girasol extraído de patatas fritas, observó una correlación muy elevada de este índice con el número de frituras ($r = 0,91$ $p < 0,01$).

- El índice de refracción presentó una correlación elevada con el índice de color ($r = 0,9363$; $p < 0,01$) y en menor medida con la K270 e índice de acidez. Además tuvo correlación positiva con el número de frituras ($r = 0,8457$; $p < 0,01$), datos que similares a los de Cuesta y col. (1991b) friendo patatas en aceite de oliva donde señalan una buena correlación entre el índice de refracción y el grado de alteración del aceite. En la tabla 17 se observa que no existe correlación significativa entre este índice y los compuestos polares ($r = 0,449$; NS), en contraposición Cuesta y col. (1991b) sí encontraron correlación de dicho índice con los compuestos de alteración total de un aceite de oliva usado en frituras de patatas.

Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes (1988) señalan que las variaciones del índice de refracción son paralelas a la formación de polímeros de la grasa calentada.

Cuesta y col. (1991a) obtuvieron para un aceite de oliva utilizado en frituras de patatas, correlaciones más elevadas entre los índices clásicos y los porcentajes de ésteres metílicos no polares, que entre aquellos y el porcentaje de triglicéridos no polares. Dichos autores explicaban estas correlaciones más elevadas basándose en un trabajo suyo anterior (Hernández y col., 1989), donde se indicaba que la determinación de ésteres metílicos era más específica que la de triglicéridos no polares para la evaluación del deterioro de dicho aceite de oliva.

Sin embargo, Garrido-Polonio (1991) y Arroyo (1991) obtuvieron mejores correlaciones entre los índices analíticos rápidos con las fracciones no polar y polar de triglicéridos que con tales fracciones pero de ésteres metílicos.

La tabla 17 refleja las correlaciones existentes entre el contenido absoluto de ácido linoléico, oléico y esteárico en el aceite y el número de frituras. Es de destacar las correlaciones elevadas que se establecen entre el descenso del contenido absoluto de ácido linoléico (C18:2) y el número de frituras, ya que la alteración del aceite se produce a nivel de los enlaces insaturados que son más lábiles a la degradación.

Estos datos son similares a los encontrados por Garrido Polonio (1991) en el aceite de girasol del baño de fritura y por Arroyo (1991) en el aceite contenido en las patatas fritas con aceite de girasol.

En las tablas 19 y 20 se pueden observar las correlaciones existentes entre los compuestos específicos de la alteración producida, con respecto al número de frituras y a la cantidad de compuestos polares, apreciándose las bajísimas correlaciones que se establecen entre la cantidad de ácidos grasos libres que hay en el aceite y estas dos variables ($r = 0,0198$ y $r = 0,4106$ respectivamente). En cambio, podemos observar que el resto de correlaciones que aparecen en la tabla 19 son muy altas, sobre todo las que se refieren a compuestos típicos de la alteración termoxidativa (polímeros de triglicéridos, dímeros de triglicéridos y triglicéridos oxidados). En la tabla 20 vemos que tanto la alteración hidrolítica como la termoxidativa se correlacionan de forma elevada y significativa con la alteración total (% de compuestos polares) ($r = 0,9615$; $p < 0,01$ y $r = 1,000$; $p < 0,01$ respectivamente).

Datos similares encontró Arroyo (1991) al analizar el aceite extraído de patatas fritas en girasol, así la correlación que obtuvo fue ($r > 0,97$; $p < 0,01$) para los compuestos formados por la alteración termoxidativa con el número de fritura.

Sánchez-Muniz y col. (1991b) obtuvieron resultados similares al analizar el aceite de girasol procedente de 15 frituras sucesivas de patatas.

Estos resultados sugieren que en el seguimiento de la alteración de un aceite de girasol utilizado en fritura de patatas puede ser tan válido la utilización del índice de acidez y el índice de color como la separación cromatográfica de las fracciones polares de triglicéridos, siempre que se contara con valores analíticos iniciales conocidos.

5.2. EFECTOS DE LA INGESTA DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SOBRE PARAMETROS DE EVALUACION NUTRICIONAL Y TOXICOLOGICO, LIPEMIA Y LIPOPROTEINEMIA DE RATAS.

5.2.1. Efectos sobre Ingesta y Peso.

En la tabla 21 y gráfica 15, se presentan las ingestas de dieta, proteína y grasa de los lotes experimentales (crudo y fritura 75) durante un periodo de 27 días.

Globalmente, se observa un gran paralelismo en las ingestas acumuladas para todos los nutrientes durante los distintos días de la experiencia para ambos lotes.

Esta similitud de la ingesta debe referirse al contenido prácticamente isocalórico de ambas dietas experimentales, 420,63 Kcal/100 g para el lote crudo a 421,04 Kcal/100 g en el lote que consume la grasa frita.

Por otro lado, dada la similitud de la composición de las dos dietas estudiadas (la única diferencia es el tipo de grasa, tabla I) la ingesta total de proteína y grasa fue equivalente.

Estos mismos resultados fueron observados por Rodríguez y col. (1984) utilizando como fuente grasa aceite de oliva y grasa vegetal crudos y utilizados en 30 frituras repetidas de patatas.

En la gráfica 16, observamos el gran paralelismo que existe en la ingesta total de las dietas experimentales en ambos lotes, así Bucko y col. (1969), estudiaron la influencia sobre la ingesta de varias grasas vegetales, encontrando que el aceite de girasol respondía de igual forma, tanto crudo como frito.

Guit y James (1975) indican que la palatabilidad de la dieta se incrementa con el índice de saturación de la grasa de la misma. Los datos obtenidos en esta experiencia, nos muestran que el índice de saturación para el aceite crudo fue significativamente superior que para el aceite procedente de 75 frituras ($8,35 \pm 0,04$ vs $8,70 \pm 0,02$ $p < 0,05$).

En nuestro estudio, no se han encontrado diferencias significativas ni de la ingesta total, grasa y proteica durante el desarrollo de la experiencia, por tanto esto nos confirma que el grado de alteración de la grasa no ha afectado significativamente la aceptabilidad de la dieta.

Naim y col. (1977) señalaron que existen

factores organolépticos del alimento, como el gusto, olor y la textura que podrían condicionar la ingesta del mismo. A su vez otros factores post-ingesta, pueden influir en la elección de la dieta y cantidad de la misma consumida por la rata.

Es importante puntualizar que mientras los polímeros oxidativos son desagradables al gusto, los polímeros térmicos no son fácilmente detectables (Clark y Serbia, 1991).

En esta memoria de Tesis, cómo hemos comentado, se produce un aumento de los polímeros de triglicéridos, pero es posible que estos polímeros de triglicéridos no sean desagradables al paladar de la rata y por tanto no afecten a la aceptabilidad de la dieta.

Los datos de crecimiento en términos de incremento de peso corporal aparecen en las tablas 22 y 23 y gráfica 17 donde se detalla la modificación ponderal por día y por periodo y la evolución ponderal a lo largo de la experiencia.

En la tabla 22 mostramos las variaciones de peso por día durante los distintos periodos de la experiencia, encontrando un incremento significativo ($p < 0,05$) en el periodo comprendido entre el día 14 y 17.

En la tabla 23a se reseña la evolución que sufre el peso en los distintos días de experiencia apreciándose un incremento significativo ($p < 0,05$) a partir del día 21 hasta el final de la experiencia.

En la tabla 23b observamos que el peso final (Día 28) de las ratas del lote que consume aceite procedente de 75 frituras fue aproximadamente un 12% menor que el lote crudo ($141,97 \pm 6,31$ vs $162,53 \pm 8,01$).

En la gráfica 18 se esquematiza la ingesta total y el incremento de peso de los lotes experimentales estudiados, observándose claramente la similitud en la ingesta entre ambos lotes y sin embargo, el incremento de peso total ($107,06 \pm 2,10$ vs $83,16 \pm 1,96$) del lote crudo y fritura 75 respectivamente, es un 20% menor en este último lote que en el lote crudo.

Este efecto depresor del crecimiento podría explicarse por algunas causas inherentes a la propia grasa transformada en su composición o bien por interferencias de ésta con otros nutrientes de la dieta, que impida la correcta utilización de esta última.

Así, Crampton y col. (1953) demostraron que se producía una reducción en el aumento de peso en animales,

cuyas dietas incluían altos porcentajes de aceites polimerizados.

Por otro parte Friedman y col. (1961) y Potteau y col. (1977) indican que en los aceites de fritura se forman peróxidos y polímeros responsables de la ralentización del crecimiento y disminución de peso en los animales que ingieren estos aceites utilizados en fritura.

Sin embargo Lang (1973) encontró en pruebas de supervivencia y estudios histológicos en ratas que las grasas de fritura no muestran efecto nocivo alguno, aún en el caso de que contuvieran cantidades considerables de material oxidado y polimerizado.

Respecto a la proporción de compuestos polares, (en nuestro caso un 19%) Billek (1980) indica que en condiciones domésticas o en condiciones de una práctica comercial buena, las grasas usadas en fritura, contienen entre un 10 y un 20% de compuestos polares, no encontrando ninguna diferencia sobre el crecimiento ponderal al administrar dichas grasas, sin embargo observó un descenso marcado en el peso de animales que ingerían una dieta con una proporción de polares mayor al 20%.

Rodríguez y col. (1984) en estudios realizados en nuestro Departamento, utilizando aceite de oliva y grasa vegetal similar al aceite de palma en 30 frituras sucesivas de patatas, observaron una tendencia a la disminución de peso en las ratas que ingieren el aceite utilizado en frituras con respecto a las que lo ingieren crudo. Resultados que concuerdan con los de esta memoria.

Desai y Tappel (1973) señalan que los lípidos insaturados oxidados pueden reaccionar con ciertas proteínas de la dieta, esta interacción podría perfectamente justificar las modificaciones encontradas en las curvas peso/semanas de experiencia, (gráficas, 16 y 17) del lote que consume aceite frito con respecto al lote que consume aceite crudo; Además Rafalski y col. (1978) señalan que el ácido linoléico se une selectivamente a los aminoácidos azufrados de las proteínas, disminuyendo así la utilización nutritiva de las mismas.

Por otra parte, Lhuisier y Potteau (1978) indican que debido a los monómeros cíclicos formados durante el proceso de fritura, el metabolismo de ciertas vitaminas, tales como tiamina y riboflavina está perturbado, y esto podría producir un descenso en el desarrollo del animal que consume las grasas de fritura.

Roubal y Tappel (1966) y Horigome y Minra (1974) reseñados por Nielsen y col. (1985) señalan que casi todos los aminoácidos de la dieta, reaccionan con los distintos productos de oxidación primarios y secundarios de lípidos.

Gian y col. (1985) indican que el efecto depresor en el crecimiento producido por la ingesta de una mezcla de ácidos grasos calentados, podría ser paliado con un suplemento alto de vitamina E.

Por último hay que señalar que la mayor parte de las experiencias realizadas con dietas conteniendo grasa de fritura utilizadas en frituras de patatas y pescado, los resultados obtenidos fueron muy diferentes a cuando dichas grasas fueran sólo calentadas. Pudiendo afirmarse que el calentamiento de los aceites en laboratorio produce efectos adversos mayores en los mismos, que los utilizados en un proceso de fritura.

En relación con lo expuesto anteriormente, la eficacia nutritiva de las dietas fue valorada en términos de CEA (coeficiente de eficacia alimentaria) y PER (coeficiente de eficacia proteíca), tabla 24 y gráfica 19. Ambos tratamientos dietarios, presentaron diferentes valores para el CEA y PER respectivamente durante los distintos periodos de la experiencia. Fundamentalmente en el periodo inicial (Día 0 al Día 3) y en la fase intermedia de la experiencia (Día 10 al Día 17), el CEA y el PER del lote fritura 75, descienden respecto al CEA y PER del lote crudo; no obstante estos parámetros nutricionales tienden a igualarse en los dos lotes crudo y fritura 75 en el periodo final de la experiencia, (Día 25 al Día 27), ($0,51 \pm 0,03$ vs $0,53 \pm 0,09$ para el CEA y $3,65 \pm 0,12$ vs $3,42 \pm 0,20$ para el PER).

Respecto al CEA total ($0,33 \pm 0,01$ vs $0,25 \pm 0,01$) y al PER total ($2,35 \pm 0,03$ vs $1,81 \pm 0,04$) se observan diferencias significativas entre ambos lotes estudiados.

Estos resultados están relacionados con la aceptabilidad de la dieta, el descenso de peso corporal que observamos en los animales del lote fritura 75, y las modificaciones que sufre la grasa durante la fritura, y su interacción con la fracción proteica de la dieta y otros componentes.

Leila y col. (1988) indican que el nivel de saturación de la grasa no afecta al incremento de peso, al depósito de grasa, ni al CEA.

En trabajos realizados en nuestro laboratorio, el CEA fué siempre menor en animales alimentados con dietas conteniendo grasas utilizadas en fritura, si bien la disminución del CEA tendería a normalizarse en los periodos finales de los estudios (San Feliu, 1984; Higon y col., 1985).

Sánchez-Muniz y col. (1991a) también encuentran que el CEA mejoró en la segunda parte de la experiencia en ratas alimentadas con dietas conteniendo como única fuente grasa y proteíca sardinas que habían sido fritas en aceite de oliva utilizado repetidas veces para freir dicho pescado azul.

5.2.2. Utilización Digestiva y metabólica de las dietas experimentales.

En la tabla 25 y gráfica 20 se muestran el peso y la composición porcentual en humedad, grasa y proteína de las heces de los lotes experimentales durante la última semana de experiencia.

La excrección fecal tanto en sustancia fresca (sf) como en sustancia seca (ss) fue ligeramente más elevada (aproximadamente un 5%, si bien no significativamente) en el lote fritura 75 respecto al lote crudo. El contenido en grasa fue ligeramente más elevado en el lote que ingirió el aceite de girasol utilizado en 75 frituras, lo que repercutió lógicamente en un menor porcentaje de proteínas en las heces ($14,73 \pm 0,71$ vs $13,63 \pm 0,62$ g/100g ss).

Marquez-Ruiz y col.(1990a) encontraron en animales alimentados con dieta que contenía un 12% de grasa con bajo nivel de alteración, un contenido en grasa de 2g/100g de heces mientras que se elevó a algo más de 5g/100g en animales alimentados con 12% de grasa en la que la mayoría era aceite de girasol calentado 100 horas a 100° con un contenido de triglicéridos polares muy elevado.

Viejo (1992) utilizando dietas conteniendo caseína y aceite de oliva durante 5 semanas, una más que en nuestra experiencia, encuentra una excrección de 10,4 g, durante los 7 días que duró la recogida de heces, lo que supone aproximadamente una excrección del orden del 30% más elevada que en nuestro estudio ($7,10 \pm 0,47$ vs $7,55 \pm 0,46$, gsf). También estas heces presentaron un contenido en humedad un 70% más elevado, pero el porcentaje de grasa de las mismas fue del orden de un 20% menor que el de nuestro estudio ($4,46 \pm 0,37$ vs $5,46 \pm 0,33$).

Estos datos se explicarían probablemente por las diferencias en el contenido de grasa de las dietas, el tipo de grasa y su alteración termoxidativa, sin olvidar la edad de los animales utilizados en ambos estudios.

La capacidad digestiva, la hemos valorado en términos de coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) para la grasa como para la proteína, este coeficiente cuantifica el porcentaje de material ingerido que es absorbido y que no aparece en heces.

Los resultados se muestran en la tabla 25 y gráfica 19, observándose que no existen diferencias significativas entre los dos lotes a los que se administra aceite crudo o frito respectivamente.

Deuel (1955) señala que hay una relación inversa entre el punto de fusión de una grasa y su digestibilidad, esta relación inversa es patente en la absorción de triglicéridos sencillos en ratas.

A priori, las grasas utilizadas en fritura cuyo índice de saturación se incrementa en relación a grasas "frescas" a causa de la disminución en la fracción de ácidos grasos poliinsaturados, podrían tener un CDA mayor.

Nuestros resultados muestran no obstante que ambos lotes tienen un CDA similar tanto para la grasa ($0,94 \pm 0,45$ vs $0,95 \pm 0,07$), como para la proteína de la dieta ($0,92 \pm 0,02$ vs $0,92 \pm 0,02$).

Según Jaerros y Chittendon (1955), el CDA para la grasa es muy elevado, y la proporción de proteína no modifica la digestibilidad de la grasa.

Respecto al efecto que el tipo de grasa dietética pueda ejercer sobre la eficacia digestiva, no existe una unanimidad de criterios, aunque en líneas generales toda grasa cuyo punto de fusión esté por debajo de la temperatura corporal presenta coeficientes de digestibilidad muy satisfactorios (Deuel, 1955).

Varela y col. (1967) y Navarro y col. (1982) indicaron que la digestibilidad de la grasa no se modifica, independientemente del tipo de grasa que se emplee (animal o vegetal).

Varela y Sánchez-Muniz (1986) encuentran que el coeficiente de digestibilidad real de diferentes aceites empleados diez veces para freír patatas, carne de vacuno o sardinas fue muy elevado. También lo fue el CDA de un aceite de oliva utilizado en un comedor colectivo para

freir diferentes alimentos después de ser desechado para su empleo posterior.

Potteau y col. (1977,1978) encontraron que la utilización digestiva de los aceites disminuía al incrementarse el grado de polimerización de los mismos, apareciendo una parte de estos polímeros en heces. Seguimos insistiendo que esta polimerización sucede en mucha mayor cuantía en grasas sobrecalentadas que en grasas utilizadas en fritura de forma ordenada.

Sin embargo la igualdad de resultados obtenidos en los CDA de la grasa y proteína plantea una hipótesis que pensamos podría ser importante estudiar en trabajos posteriores.

Como hemos indicado con anterioridad las ingestas de ambos lotes fueron muy similares, sin embargo el incremento de peso y por tanto el CEA estuvo disminuido significativamente en el lote fritura 75 (Tabla 24).

Por otro lado la excrección fecal total de grasas y proteínas fue muy similar, lo que explica la igualdad de resultados obtenidos para los CDA de grasa y proteína. Por tanto las posibles interacciones entre aminoácidos y grasa de la dieta que explicarían la depresión del crecimiento no parecen producirse a nivel digestivo, pudiendo muy posiblemente tener lugar esta interacción a nivel metabólico es decir, una vez absorbidos los componentes aminoacídicos y grasos de la dieta. Así, la ingestión de grasas termoxidadas, así como de los productos termoxidativos aislados ha sido relacionada con efectos fisiológicos adversos (Combe y col., 1984; Cuesta y col., 1988; Blumenthal, 1991).

Márquez-Ruiz y col. (1990a) ha señalado la elevada digestibilidad de los compuestos de oxidación, monómeros, dímeros y polímeros de origen térmico.

Poling (1970) y Nolen y col. (1973) sugieren que los materiales monoméricos y diméricos se absorben más rápidamente y por tanto son más tóxicos, que los polímeros.

Sin embargo, Márquez-Ruiz (1990) en estudios con ^{14}C señala la posibilidad de cambios estructurales previos a su absorción de las moléculas de polímeros oxidados que disminuirían su peso molecular y que explicarían la mayor digestibilidad de los compuestos de polimerización frente a los dímeros de origen térmico.

Por otra parte, como se observa en la tabla 26 y gráfica 21, la excrección fecal de colesterol y fosfolípidos no se afectó significativamente por la

ingesta de aceite de girasol utilizado en 75 frituras de patatas respecto al aceite sin usar ($5,41 \pm 0,41$ vs $4,73 \pm 0,27$ mg colesterol/semana).

La ligera tendencia a incrementar la excrección de colesterol y fosfolípidos del lote fritura 75 respecto al crudo, se explica por la tendencia a una mayor excrección de heces y grasa en heces en dicho lote (Tabla 25).

Viejo (1992) en ratas Wistar machos alimentados durante 5 semanas con aceite de oliva y caseína encontró una excrección de colesterol de $4,15 \pm 0,32$ mg/día, mucho mayor a la encontrada en este estudio.

Por tanto según datos de nuestra experiencia las modificaciones encontradas en la colesterolemia (la cual se discutirá más adelante), como consecuencia de la ingesta de aceite utilizado en fritura respecto al aceite no usado, no parecen corresponderse con modificaciones en la excrección de dicho esteroide, ya que el lote fritura 75 presentó niveles de colesterol superiores al lote crudo, pero no de la excrección de colesterol.

Como es bien sabido, en animales cuyas dietas tienen un bajo contenido en colesterol, la forma preferencial de eliminar el colesterol del cuerpo es como sales biliares (Slater y col., 1980), cuya determinación no ha sido realizada en esta Tesis.

5.2.3. Efectos del consumo de las dietas experimentales sobre peso del hígado, composición porcentual e índice hepatosomático.

En la tabla 27 y gráficas 22 y 23 se presentan la composición porcentual hepática en humedad y grasa y los pesos de hígados e índice relativo hepatosomático de los lotes experimentales crudo y fritura 75. Estos datos se comparan con los de un lote basal alimentado con dieta estándar integrado por ratas de 65 g de peso.

El peso del hígado en las ratas después de 4 semanas de experiencia tanto del lote crudo como el de lote fritura 75 fue similar ($5,86 \pm 0,42$ vs $5,76 \pm 0,37$ g sf) no encontrándose diferencias significativas.

Estos datos son paralelos a los de Viejo (1992) el cual encontró en el lote alimentado con 15% de caseína más 10% de aceite de oliva un peso de hígado de $5,4 \pm 0,14$ g sf a las 3 semanas de experiencia y de $6,23 \pm 0,28$ g sf a las 5 semanas.

El incremento ponderal hepático no fue paralelo al del peso de los animales ya que el lote basal presentó un índice hepatosomático de $3,19 \pm 0,12$ significativamente menor que el del lote crudo ($3,59 \pm 0,16$) y éste menor que el del lote fritura 75 ($4,04 \pm 0,13$).

Estos datos sugieren un efecto, aunque no muy marcado, de la dieta conteniendo el aceite utilizado en 75 frituras sobre el índice hepatosomático.

Rodríguez y col. (1984) no encontraron ninguna diferencia significativa en el tamaño del hígado e índice hepatosomático en ratas alimentadas con dietas conteniendo un 15% de grasa (aceite de oliva o grasa vegetal sólida, la cual tenía una composición similar al aceite de palma) que habían sido utilizadas 30 veces para freír patatas respecto a otra dieta que contenía la misma proporción de grasa pero sin ser usada en fritura.

Los datos obtenidos del índice hepatosomático para el lote crudo fueron más elevados que los obtenidos por Viejo (1992) en un lote que recibía en su dieta un 15% de caseína, mas un 10% de aceite de oliva. La alteración total del aceite de girasol usado en la dieta del lote crudo fue del 5,09%, bastante más elevado que la encontrada en aceites de oliva utilizados como en grasas de dietas basales (entre 2% y 3,5%) en experiencias de nuestro Departamento (Sánchez-Muniz y col., 1990a; Pérez-Granados, 1990). Esto podría explicar el índice hepatosomático elevado encontrado en el lote crudo.

Como ya se ha comentado con anterioridad el incremento de peso en las ratas del lote fritura 75 fue un 20% menor que el lote crudo a pesar de observarse una ingesta similar. Estos datos sugieren un efecto equivalente a una malnutrición proteíca debida probablemente, como ya se ha comentado, a la interacción de los aminoácidos de la dieta con las grasas modificadas, lo que repercute en una disminución de la digestibilidad proteíca y grasa, por tanto en un menor coeficiente de eficacia alimentaria de la dieta.

Se ha descrito (Sánchez-Muniz y col., 1991a) un efecto de malnutrición proteíca con incremento en el índice hepatosomático ($6,3$ vs $7,8$) así como un efecto potencial hepatotóxico de dietas conteniendo sardinas fritas en un aceite que había sido utilizado un número elevado de veces respecto a otras dietas conteniendo sardinas fritas en un aceite utilizado sólo 1 ó 2 veces. Potteau y col. (1977,1978) indican que los aceites de fritura usados a altas temperaturas o por largo tiempo producen un incremento del índice hepatosomático, datos que concuerdan con los datos de este estudio, si bien ya se indicó lo moderado de este incremento para dicho índice.

El contenido de humedad de los hígados de los lotes experimentales fué significativamente menor en el lote fritura 75 ($71,51 \pm 0,28\%$) respecto a los lotes crudo ($72,28 \pm 0,75\%$) y basal ($73,02 \pm 0,67\%$).

Viejo (1992) describió tanto a las 3, como a las 5 semanas de experiencia en los lotes alimentados con caseína más aceite de oliva un contenido de humedad en hígado similar al de esta memoria.

Sin embargo, el contenido graso hepático (tabla 27 gráfica 23) fue más elevado en los lotes crudo ($3,98 \pm 0,26$ g/100 g sf) y lote fritura 75 ($4,18 \pm 0,15$ g/100 g sf) que en el lote basal ($3,47 \pm 0,24$ g/100 g sf) observándose un incremento graso significativo ($p < 0,05$) en el lote fritura 75 respecto al lote crudo y basal respectivamente.

Estos datos podrían estar relacionados en primer lugar con el acúmulo graso que se produce con la edad, aunque también con el mayor contenido graso de las dietas experimentales (crudo y fritura 75) respecto a la dieta basal. (Tabla 11).

Viejo (1992) en las experiencias ya comentadas encontró un contenido graso (sf) en los lotes basales de 3,47%, de 4,16% a las 3 semanas y de 6,35% a las 5 semanas de experiencia.

Como se discutirá más adelante estas pequeñas diferencias encontradas en el contenido graso hepático del lote crudo y del lote fritura 75 no justificarían la presencia de áreas de degeneración vacuolar encontradas en el estudio histológico.

Cabe la hipótesis que la grasa contenida en los hígados del lote fritura 75 esté más alterada que la del lote crudo y aún estando en concentraciones similares, los efectos producidos sean bastante diferentes.

5.2.4. Efectos del consumo de las dietas experimentales sobre Lípidos hepáticos.

Como hemos indicado en el apartado anterior, el contenido graso hepático se incrementó respecto al lote basal tanto para el lote crudo como para el lote fritura 75.

En la tabla 28a y gráfica 24 podemos observar que el contenido de colesterol total (CT) y triglicéridos (TG) hepáticos expresados en mg/g de hígado en los 3

lotes experimentales (basal, crudo y fritura 75) es similar, sin embargo existe un incremento claro de los niveles de fosfolípidos (FL) en el lote crudo respecto a los otros dos lotes.

Respecto al lote basal (para valores expresados en mg totales; tabla (29a) el enriquecimiento más marcado en el lote crudo fue la fracción de FL, 5,47 veces seguido del CT, 3,23 veces y de los TG, 2,29 veces, mientras que en el lote 75, el incremento de FL, CT y TG fue respectivamente de 4,58, 2,75 y 2,82 veces.

Sin embargo cuando los datos se expresan en mg/g de grasa (tabla 29b y gráfica 25) o mg/g de hígado (tabla 28) el contenido de FL es del orden de 2 veces en el lote crudo y de 1,4 veces en el lote fritura 75 que en el lote basal, mientras que el contenido de TG tiende a ser menor, no encontrándose prácticamente diferencias respecto al contenido de CT.

Según Viejo (1992) los niveles de FL expresados en mg totales fueron del orden de 2 veces más elevado en ratas alimentadas durante 3 semanas con caseína más aceite de oliva, pero del orden de la mitad que aquellos animales que recibieron dicha dieta durante 5 semanas. Lo que sugiere un efecto del tiempo de experiencia sobre el enriquecimiento en FL, lo cual se confirma en nuestro estudio.

Las tendencias inversas observadas en el lote frito respecto al lote crudo (menor contenido en hígado de FL y mayor de TG) podría explicarse bien por una deficiente síntesis hepática de VLDL (como consecuencia probable de que los ácidos grasos peroxidados no sean sustratos adecuados para la formación de lipoproteínas, aspecto que discutiremos más adelante o bien por su disponibilidad más reducida de FL necesarios para la formación y secreción hepática de VLDL (Yao y Vance., 1988).

En los microsomas hepáticos se encuentra la Acil-CoA sintetasa enzima necesaria para la síntesis de intermediarios del ciclo Acil-CoA utilizados para la biosíntesis de TG y FL por la vía del alfa-glicerol fosfato.

La tendencia a la disminución (aproximadamente 17%) en el contenido de FL hepáticos (tabla 29) del lote fritura 75 respecto al lote crudo ($93,93 \pm 6,38$ mg vs $112,14 \pm 0,78$ mg totales de hígado) podría explicarse por una menor utilización hepática de los ácidos grasos alterados para síntesis de FL. Sin embargo la relación encontrada por otros autores entre el perfil de ácidos grasos de la dieta y la biosíntesis de novo de FL (Khun

Thi-Dinh y col., 1990), no se ha encontrado en esta memoria de Tesis Doctoral ya que la mayor saturación de la dieta consumida por el lote crudo (tabla 11) no se corresponde con una menor concentración de FL hepáticos.

El cociente colesterol/fosfolípidos (CT/FL) se relaciona inversamente con la fluidez de las membranas biológicas (Schachter, 1984).

En nuestra experiencia (datos no presentados) el cociente CT/FL del lote crudo (aproximadamente 0,19) fue muy similar (aproximadamente 0,19) al del lote fritura 75 (aproximadamente 0,20) pero bastante más bajo que en el lote basal (aproximadamente 0,34). Estos resultados indican de acuerdo con lo señalado por Fernández-Sánchez (1991) que los componentes lipídicos de la dieta constituyen un determinante importante en la modulación de colesterol y fosfolípidos de las membranas microsómicas y por tanto muchas funciones propias de estas membranas pueden resultar afectadas: activadores enzimáticos (NADPH, citocromo P450, oxidoreductasa, formación de VLDL, formación de fosfolípidos en otras estructuras celulares, etc.).

5.2.5. Efectos del consumo de las dietas experimentales sobre la Composición en ácidos grasos totales hepáticos

En la tabla 30 y gráficas 26 y 27, se presenta la composición de ácidos grasos hepáticos en ambos lotes experimentales y también del lote basal alimentado con dieta estándar de laboratorio.

El lote crudo presentó respecto al basal un incremento significativo en el porcentaje de ácido linoléico (C18:2 n-6) y del total de monoinsaturados (MUFA) debido principalmente a la cantidad presente en este lote del ácido nervónico (C24:1 n-11), el cual no se detectó en el lote basal. A la vez existe una disminución del total de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA n-3) debido principalmente al menor porcentaje de ácido docosaheptaenoico (C22:6 n-3).

En el lote fritura 75 se encontró respecto al lote basal un incremento no significativo en el ácido linoléico (C18:2 n-6), aunque sí se incrementó significativamente el ácido araquidónico (C20:4, n-6). El total de MUFA se incrementó significativamente mientras el total de PUFA n-3 disminuyó.

Cuando se comparan el lote crudo frente al lote

de las actividades de las Delta 5-desaturasa, elongasa y Delta 6 desaturasa. La disminución del cociente anterior en el lote fritura 75 respecto al lote basal fue de menor cuantía.

Estos resultados explican la existencia de un cociente C20:4/C18:2, (tabla 30, gráfica 28), más elevado en el lote que recibe aceite de girasol más alterado después de 75 frituras que en el lote crudo.

Se plantea la hipótesis de una demanda incrementada de la síntesis de ácido araquidónico a partir del ácido linoléico en el lote fritura 75 respecto al lote crudo, lo cual explicaría el incremento del cociente C20:4/C18:2 con la finalidad de asegurar un porcentaje no despreciable de ácidos grasos, preferentemente de ácido linoléico, que está disminuido.

5.2.6. Estudio histológico

Aún cuando la peroxidación lipídica puede jugar un papel esencial para el desarrollo y maduración de células (Servanian y Hochstein, 1985) esta circunstancia puede convertirse en lesiva para las células cuando la peroxidación lipídica tiene lugar mediante una vía que conduce a una cadena de reacciones mediadas por radicales libres. En estas condiciones, los productos de peroxidación lipídica pueden contribuir a una cascada citotóxica. Estas reacciones tóxicas comprenden aspectos de genotoxicidad e inflamación asociado con daño hepático y reparación celular. (Mukai y Goldstein, 1976; Emerit y col., 1983 y Servanian y Peterson, 1984).

La formación de peróxidos lipídicos aparece asociada y puede ser necesaria para los procesos de inflamación, teniendo lugar la producción de productos derivados mediante la acción de la ciclooxigenasa y lipoxigenasa que sirven como potentes factores vasoactivos y quimiotácticos. Otros productos de peroxidación de naturaleza diferente a leucotrienos y prostaglandinas pueden tener también acciones biológicas similares.

Gran parte de esta actividad, podría ser simplemente resultado de un efecto "permisivo" ejercido por los lípidos peroxidados sobre la síntesis de prostanoides.

Marshall y Lands (1984) mostraron que los activadores de peróxidos lipídicos generados por neutrófilos incrementaban la síntesis de prostaglandinas

específicas. Además se ha observado que mezclas de peróxidos de ácido eicosatetraenoico afectan la agregación plaquetar (Roycroft y col., 1977), mientras que otros productos de oxidación del ácido araquidónico y otros ácidos grasos polienólicos poseen propiedades quimioatrayentes para leucocitos (Turner y col., 1975). Macord y Petrone (1982) sugieren que productos de peroxidación lipídica formados por vía de reacción de radicales libres tienen la capacidad de interaccionar con componentes del suero y formar productos quimioatrayentes.

A este respecto, en el estudio histológico realizado por el Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, se indica que los hígados de los animales del lote basal presentan características histológicas que pueden considerarse dentro de la normalidad. Se aprecia una correcta estructuración de los lobulillos hepáticos y de los espacios porta. A mayores aumentos, todos los elementos celulares que integran el hígado, se encuentran en una proporción numérica adecuada y presentan unas características estructurales típicas. Los hepatocitos poligonales poseen un núcleo eucromático situado en el ecuador celular que muestra un nucleolo muy evidente. La proporción de hepatocitos binucleados observada es normal. El citoplasma finamente vacuolizado presenta diversos grados de eosinofilia dependiendo de su actividad funcional. Las células de Kupffer situadas a nivel sinusoidal no presentan signos de movilización macrofágica. A nivel vascular no se observan alteraciones. El sistema de canalículos y canales biliares, tapizados estos últimos por un epitelio cúbico, muestran así mismo una estructura y proporción numérica normal (Figs. 7, 8 y 9).

Sin embargo en 9 de 10 animales estudiados en el lote crudo, los hígados presentaron procesos degenerativos entre muy ligeros y ligeros, algunos de ellos con vacualización celular moderada (Figs. 10, 11 y 12). Destacan infiltrados inflamatorios dispersos, integrados por células redondas, que se sitúan intersticialmente (Fig. 13) y a nivel periportal (Fig. 14).

Lógicamente, pensamos que estos procesos degenerativos (entre ligeros y muy ligeros) se deben a cadenas de producción de radicales libres promovidos por la existencia de lípidos peroxidados presentes en las dietas, que si bien no eran muy elevados (5,1% de compuestos polares) podrían ser suficientes para iniciar mecanismos de citotoxicidad e inflamación, los cuales serían probablemente potenciados por la presencia en la dieta de la asociación de BHT y BHA, como se discutirá más

adelante.

En el lote fritura 75 el grado de lesión que se observa en el hígado fue más intenso que en el lote crudo, encontrándose alteraciones degenerativas en todos los animales, aunque el grado de tumefacción de los hepatocitos osciló entre ligero (Figs. 15 y 16) y moderado (Figs. 17, 18 y 19). Así Kanazawa y col. (1985) indican que tanto los hidroperóxidos del ácido linoléico como los productos secundarios de oxidación de este ácido son absorbidos a la circulación sistémica e incorporados al hígado, produciendo efectos de hipertrofia hepática, incremento de la actividad de las transaminasas séricas y elevación de los niveles de lípidos peroxidados hepáticos en la rata.

La peroxidación de membranas lipídicas en el lugar de la lesión podría conducir a la salida de fragmentos de lípidos peroxidados de los fosfolípidos de membrana a través de reacciones enzimáticas específicas. A este respecto se ha indicado que las fosfolipasas pueden hidrolizar lípidos rápidamente en diferentes sistemas de membrana (Zeman y Siakotos, 1973; Barker y Brin, 1975; Kagan y Schvedova, 1978; Servanian y col., 1983). Es posible que esta actividad contra fosfolípidos de membrana oxidados o dañados esté relacionado con un mecanismo general de renovación de membranas (Turnover) y pueda por tanto ser un componente importante en el mantenimiento de la funcionalidad de las mismas.

En el 60% de los animales del lote crudo, los procesos degenerativos ligeros ya comentados, iban acompañados de áreas de regeneración que se caracterizan por mostrar hepatocitos de mayor tamaño con citoplasma eosinófilo y núcleos de mayor intensidad cromática (Fig. 20).

Uno de los hígados estudiados del lote crudo presentaba lesiones regenerativas más intensas (Fig. 20) y a su vez iba acompañado de zonas regenerativas más extensas con abundantes figuras mitóticas (Fig. 21).

En el lote fritura 75, los procesos reconstitutivos del parénquima ofrecían áreas de hepatocitos jóvenes con citoplasma acidófilo con figuras mitóticas propias de la regeneración de los órganos con poblaciones celulares estables (Figs. 16, 22 y 23). En los órganos de estos animales se observan procesos inflamatorios con células mononucleadas dispersas sin formar granulomas.

Estudios de Servanian y Hochstein (1985) indican que la actividad de la fosfolipasa A2 puede estar relacionada a sistemas jerárquicos de autodefensa y reparación que pueden prevenir o minimizar el daño

peroxidativo de las membranas celulares. Por ejemplo la disponibilidad de glutathion-oxidasa para reducir los hidroperóxidos localizados en las membranas está facilitada por su separación de los fosfolípidos y el vertimiento en la fracción citosólica de la célula. En una membrana sometida a bajos niveles de peroxidación lipídica, como en el caso del lote crudo, esta función de la fosfolipasa podría minimizar la propagación de reacciones de radicales libres cortando la formación de especies de propagación en la membrana y contribuir a los mecanismos de reparación y regeneración celular y tisular.

Por otra parte, membranas sometidas a una más extensa peroxidación (lote fritura 75) podrían ser rápidamente degradadas por una activa fosfolipasa endógena cuya acción hidrolítica excedería la reacidilación y los sistemas de síntesis fosfolipídica, haciendo más lentos los mecanismos de regeneración celular.

Como ya se ha comentado en el apartado 5.2.4. el cociente CT/FL del lote crudo (aproximadamente 0,19) fué muy similar al del lote fritura 75 (aproximadamente 0,20) pero bastante más bajo que el lote basal (aproximadamente 0,34). Estos resultados indican de acuerdo con lo señalado por Fernández-Sánchez (1991) que los componentes lipídicos de la dieta constituyen un determinante importante en la modulación de colesterol y fosfolípidos de las membranas microsómicas y por tanto muchas funciones propias de estas membranas pueden resultar afectadas: activadores enzimáticos (NADPH, citocromo P450, oxidoreductasa, etc.).

Paralelamente, el cociente C20:4/C18:2 que es el índice de las actividades de las Delta 5-desaturasa, elongasa y Delta 6-desaturasa es más elevado en el lote que recibe aceite de girasol más alterado después de 75 frituras que en el lote crudo; se plantea la hipótesis de una demanda incrementada de la síntesis de ácido araquidónico a partir del ácido linoléico en el lote fritura 75 respecto al lote crudo.

Giani y col. (1985) han encontrado una modificación (disminución) en la producción de eicosanoides cuando se consumen dietas conteniendo grasas modificadas por procesos térmicos y de fritura, debido a una reducción de la disponibilidad de ácido linoléico para la producción de eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos) a partir de araquidónico.

A la vez, hay que tener en cuenta que de forma parecida a muchos compuestos xenobióticos, los efectos tóxicos del BHT parecen causados por metabolitos más que por los compuestos originarios (BHT, per sé). Bajo un

punto de vista toxicológico uno de los metabolitos más interesantes del BHT es la BHT-metilquinona (2,6 di-ter-butil-4-metilen-2,5-ciclohexadienona). Este metabolito se ha descrito en el hígado de rata (Takahashi y Hiraga, 1979; Tajima y col., 1981) producido por la biotransformación de BHT por un enzima relacionado con el citocromo P450 (Kehrer y Witschi, 1981; Tajima y col., 1985) y capaz de reaccionar con varios nucleófilos celulares, incluido el glutathione (Tajima y col., 1983, 1985). La administración de altos niveles de BHT ha sido relacionada con depleción de los niveles de glutathione en el hígado de rata y en el pulmón de ratón (Mizutani y col., 1984; Nakagawa y col., 1984).

Según Thomson y col. (1986) la activación peroxidativa "in vitro" de BHT con formación de BHT-metilquinona se incrementó enormemente en presencia de BHA, mientras que en ausencia de BHA, no se detectó formación de BHT-metilquinona.

Estos resultados sugieren un efecto sinérgico de ambos antioxidantes. En productos alimenticios un incremento del efecto protector antioxidante puede obtenerse por la combinación de varios de ellos, atribuyéndose la efectividad de la combinación a la capacidad de regeneración de los mismos. (Chen y Shaw, 1974; Kurechi y col., 1980).

Sin embargo en un trabajo de Kurechi y Kato. (1982) estudiando el efecto sinérgico de la combinación BHT más BHA en la donación de hidrógeno al radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, estos autores explican el incremento de la donación de hidrógeno a la regeneración de la molécula de BHA, la cual se produce a expensas de convertir el BHT en BHT-metilquinona.

Según Thomson y col. (1986) utilizando ácido araquidónico como sustrato (componente mayoritario de los fosfolípidos de membrana) el BHA estimula la unión covalente del BHT en diferentes tejidos de animales y humanos. Usando peróxido de hidrógeno como sustrato el BHA incrementó la unión del BHT a los microsomas de pulmón en rata, ratón y hombre, así como en intestino de rata.

Estos resultados indican que las peroxidasas de muchos tejidos de mamífero puede peroxidar el BHT a intermediarios metabólicos, los cuales pueden unirse covalentemente a proteínas y que este mecanismo puede ser incrementado por la presencia de BHA, presumiblemente a través de la formación a partir del BHT de una metilquinona reactiva.

Aún cuando las dosis de BHT y BHA usadas en este

estudio son bajas (alrededor de 50 mg/Kg de peso/día) y probablemente la concentración de BHT esté muy por debajo del umbral para causar daño hepático (150-250 mg/Kg de peso/día de BHT), es posible que la utilización de BHA junto al BHT incremente varias veces la toxicidad de esta última sustancia.

Thomson y col. (1986) señalan los efectos de varias dosis de BHA en la toxicidad pulmonar inducida por BHT. El BHT causaría la destrucción de células alveolares tipo I (Marino y Mitchell, 1972) y células pulmonares endoteliales (Smith, 1983), siendo esta respuesta tóxica reversible (6-10 días), aún cuando un segundo stress impediría la proliferación y procesos de recuperación por pneumocitos tipo II.

En nuestro estudio surge la hipótesis que la sinergia del BHT y BHA para contrarrestar los niveles más bien bajos de ácidos grasos alterados (absorbidos de la dieta y producidos metabólicamente) presentes en los hígados del lote crudo, produciría niveles de BHT-metilquinona no muy elevados a los que los animales responderían adaptándose y poniendo en marcha mecanismos regenerativos ya comentados en el lote crudo. Sin embargo la presencia de más altos niveles de productos peroxidados (lote fritura 75) escaparía del poder antioxidante de los tocoferoles, influyendo mucho sobre el sinergismo BHT-BHA y por tanto sobre la producción elevada de BHT-metilquinona, la cual podría deplecionar la concentración de sustratos, tan importantes como el glutathione, necesarios para la eliminación de radicales libres, haciendo mucho más dificultosos los mecanismos de regeneración celular.

A la vista de los resultados obtenidos en el estudio histológico, creemos que en futuras experiencias con animales alimentados con altos niveles de aceite de girasol conteniendo niveles intermedios ó elevados de productos polares, sería aconsejable incrementar en la dieta el contenido de antioxidantes naturales (p.e, tocoferoles) y evitar la inclusión conjunta de BHT y BHA.

5.2.7. Efectos sobre la lipemia de la incorporación a la dieta de aceite de girasol "crudo" o utilizado en fritura frente a los valores iniciales de un lote basal.

La relación que existe entre los ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) y los niveles de lípidos plasmáticos, como ya se ha descrito en el apartado 1.5.3, es bien conocida desde

hace más de 20 años (Keys y col., 1957) siendo objetivo más reciente el estudio de algunos ácidos grasos en particular (Sánchez-Muniz, 1987; Beynen, 1988; Kinsella y col., 1990; Grundy y Denke, 1990), así como establecer el mecanismo íntimo por el cual producen su efecto (Oya y col., 1989; Nicolasi y col., 1990; Nestel, 1990; Grundy y Denke, 1990).

En las grasas empleadas en fritura, hemos de considerar adicionalmente las alteraciones hidrolíticas y termoxidativas con formación de polímeros que se originan en ellas. Estos cambios en las grasas de fritura pueden incidir al ser ingeridas, a parte de sus efectos tóxicos ya descritos con anterioridad, en una diferente metabolización de las mismas que se traduciría en cambios en la lipemia y lipoproteínemia.

El objetivo de este apartado, es analizar los efectos de dietas conteniendo aceite de girasol no usado y después de su utilización en frituras, sobre los niveles de lípidos sanguíneos, así como sobre las lipoproteínas plasmáticas.

Antes de comenzar la discusión de los datos obtenidos en este trabajo, creemos conveniente recordar que el mismo se ha llevado a cabo en animal entero y que la especie elegida fue la rata, la cual presenta ciertas peculiaridades metabólicas como ya se ha comentado en la Revisión Bibliográfica.

La discusión de resultados está basada en unos hechos objetivos, lo que se observa en la lipemia y lipoproteínemia y por otro lado, en consideraciones subjetivas que nos ayudarán a comprender los datos obtenidos. Estas, tendrán un valor relativo y orientativo, de hacia que órganos o sistemas deberán dirigirse los experimentos en posteriores etapas para profundizar en el estudio y llegar a unas conclusiones finales sobre los mecanismos que en animal entero han llevado a esta respuesta plasmática.

También hay que tener en cuenta que partimos de unos valores de referencia (lote basal) que corresponden a animales de 65 g de peso, aproximadamente 32 días de edad y que ingieren dieta estándar de laboratorio.

Según los datos que se muestran en la tabla 31 y gráficas 29 y 30, las ratas que ingieren en su dieta un 15% de aceite de girasol crudo, muestran unos niveles de colesterol total (CT), libre (CL) y colesterol esterificado (CE) significativamente menores que los del lote basal ($67,04 \pm 2,90$ vs $87,20 \pm 7,60$ mg/dl; $8,05 \pm 0,44$ vs $14,01 \pm 1,73$ mg/dl, y $58,99 \pm 2,65$ vs $72,33 \pm 6,68$ mg/dl respectivamente). Los fosfolípidos (FL)

tienden a incrementarse de forma no significativa, mientras que los triglicéridos (TG) se incrementan significativamente ($34,61 \pm 1,57$ vs $17,90 \pm 1,75$ mg/dl).

En esta investigación el efecto hipocolesterolemizante observado en el lote de ratas que ingieren aceite de girasol crudo frente al lote basal puede ser atribuido al ya conocido efecto hipocolesterolemizante de los PUFA (Keys y col., 1957; Vega y col., 1982; Vessby y col., 1982; Ehnholm y col., 1984; Nestel, 1987 y Grundy y Denke, 1990), ya que si bien el contenido porcentual de ácido linoléico y del total de n-6 fue muy similar en ambas dietas (tabla 11), el contenido graso fue muy diferente (aproximadamente 2,6% en el lote basal, 15% en el lote que consume dieta conteniendo girasol crudo, tablas I y VI), lo que implica ingestas muy superiores de PUFA n-6 (principalmente ácido linoléico) en el lote crudo.

Beynen y Katan, (1985) también indican una síntesis menor de lipoproteínas como efecto inducido por los PUFA, lo que se traduciría en menores niveles lipoproteícos en suero, aspecto que discutiremos más adelante.

En las tablas 31 y gráficas 29 y 30 se observa en las ratas que ingieren dieta conteniendo como aporte graso un 15% de aceite de girasol procedente de 75 frituras, respecto a las que ingieren la misma cantidad de girasol sin usar, una elevación significativa del CT ($83,22 \pm 2,12$ vs $67,04 \pm 2,90$), CL ($12,65 \pm 1,74$ vs $8,05 \pm 0,44$) y CE ($70,56 \pm 2,44$ vs $58,99 \pm 2,65$).

Hay que señalar que el lote fritura 75 presentó niveles similares de CT, CL y CE a los del lote basal.

En un estudio realizado anteriormente por nuestro equipo (Cuesta y col., 1987a) se analizó el efecto sobre la lipemia de un aceite de oliva crudo y después de ser empleado en 30 frituras sucesivas de patatas sin renovación de aceite. La secuencia metabólica observada en el lote oliva frito respecto al lote oliva crudo fue un aumento significativo del CT y CE, no afectándose los ácidos grasos libres, el CL, ni los FL, aunque éstos últimos presentaron tendencia a elevarse (aproximadamente 11%).

En un estudio paralelo Sánchez-Muniz y col. (1986) estudiaron el efecto sobre la lipemia de ratas de una grasa sólida (plantina), utilizada en la industria alimentaria, con una composición similar al aceite de palma. Dicha grasa alimentaria se introdujo en las dietas como única fuente grasa antes y después de su utilización en 30 frituras de patatas apreciándose

pequeños cambios, aunque los efectos sobre el metabolismo lipídico recordaban a los observados en la experiencia con aceite de oliva utilizado en frituras, es decir, existía una tendencia al incremento, aunque no significativa del CT y CE; siendo la modificación de los FL en este caso significativa y opuesta a la reducción de los niveles de TG.

En el presente estudio, como ya hemos comentado, existe un incremento del CT como consecuencia del incremento tanto del CL como del CE (tabla 31).

Simko y col. (1964) han indicado también que las grasas animales fritas y el aceite de girasol empleado en frituras elevaban la colesterolemia y el nivel de Betalipoproteínas, lo que coincide con nuestros resultados respecto a la elevación del CT.

No obstante en un experimento en el cual fueron alimentadas ratas con grasas calentadas como palma, soja y aceite de girasol durante 13 semanas, Guillaumin y col. (1978) encontraron que los valores para el CT, lípidos totales, TG y ácidos grasos libres fueron similares a los valores de ratas alimentadas con las mismas grasas sin calentar.

Del mismo modo comparando los efectos de la ingesta de una grasa rica en ácidos grasos insaturados, la cual había sido calentada repetidamente, con los efectos de la misma pero sin calentar, Giani y col. (1985) no observaron modificaciones en el CT, pero registraron un decrecimiento sustancial en los TG.

Tomassi (1983) encontró que el CT y los TG bajaban cuando se administraba la fracción polimerizada oxidada de aceite de soja usado en fritura.

Kritchevsky y Tepper (1967) administraron dietas por un periodo de 8 semanas, las cuales contenían colesterol y aceite de oliva o de maíz no usados o estos mismos aceites de oliva o maíz que habían sido calentados a 215°C durante 20 minutos. El consumo del aceite de oliva calentado elevaba el colesterol plasmático en relación al nivel obtenido tras la ingesta del aceite de oliva crudo, además se observó un incremento de los TG y una disminución de los FL. Sin embargo, la extensión del ateroma era más grande en los animales que consumieron aceite de maíz que en los que fueron alimentados con aceite de oliva. Estos resultados, coinciden con los nuestros en relación al mismo efecto elevador del CT observado en ambos experimentos.

La concentración de TG séricos, bastante reducida en todos los grupos, se incrementó significativamente en

el lote crudo ($34,61 \pm 1,57$ mg/dl) respecto al lote basal ($17,90 \pm 1,75$ mg/dl), (tabla 31).

Es conocido el efecto sobre la trigliceridemia de la edad (Frerichs y col. 1976; Sánchez-Muniz y col., 1990b) y del contenido graso de las dietas (Fernández-Sánchez, 1991; Viejo, 1992). Los animales del lote basal tenían 28 días menos de edad que los del lote crudo y recibían en sus dietas un contenido graso sensiblemente menor (2,6% vs 15%).

Fernández-Sánchez, (1991) en ratas de 360 g de peso después de 18 horas de ayuno encuentran niveles de 78 mg/100 ml de TG, bastante más elevados que los encontrados en ratas basales de 65 g de peso en nuestro estudio.

Según Grundy y Vega (1988) una causa que puede conducir al incremento de los TG es la lipólisis defectuosa de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. La cascada lipolítica para los triacilglicéridos séricos depende de la interacción de las lipoproteínas con la lipoproteinlipasa y con la triglicéridolipasa hepática, y un funcionamiento distinto de estos enzimas (p.e. inducidos por la edad) podría afectar la lipólisis.

La disminución de los receptores hepáticos de las LDL y/o VLDL remanentes (que se produce con la edad, Mattson y Grundy, 1985) podría explicar las diferencias entre los TG del lote basal y los de los otros dos lotes experimentales.

También como cabría esperar las dietas con mayor contenido lipídico motivan el aumento de la síntesis hepática de triacilglicerol, pudiendo a su vez ser exportados en las VLDL y contribuir al incremento de las VLDL plasmáticas.

Rodríguez (1981), Sánchez-Muniz y col. (1986) y Cuesta y col. (1987a) encontraron en ratas no ayunadas, de 100 días de edad y aproximadamente 300 g de peso alimentadas con dietas conteniendo un 15% de grasa en forma de aceite de oliva crudo o utilizado en fritura ó de una grasa sólida (plantina) antes y después de su uso en frituras de patatas, niveles de TG de aproximadamente 115 mg/dl.

Viejo (1992) observó que la transferencia de ratas Wistar de una dieta basal (idéntica a la de este estudio) a otra conteniendo caseína y aceite de oliva elevó significativamente los triglicéridos en suero, efecto equivalente al observado en el presente estudio con caseína y aceite de girasol.

Los resultados de la tabla 31 y gráficas 29 y 30 señalan que el proceso de fritura no afectó a la concentración de TG plasmático ya que el lote girasol crudo y fritura 75 tuvieron niveles equivalentes de triglicéridos. En estudios previos (Sánchez-Muniz y col., 1986 y Cuesta y col., 1987b) la trigliceridemia no se afectó en el caso de utilizar en la dieta aceite de oliva crudo respecto a la plantina cruda, lo que sugiere que los cambios que se producen en la insaturación de la grasa utilizada en fritura no se relacionan con las alteraciones de los niveles de triglicéridos séricos.

Los niveles de FL (tabla 31) fueron similares en el lote basal ($108,47 \pm 12,28$ mg/dl) y el lote girasol crudo ($110,12 \pm 2,96$ mg/dl). Estos datos contrastan con el incremento de TG y la disminución de CT, CL y CE encontrados en el lote girasol crudo ya discutida. Algunos autores (Pelech y col., 1983) han sugerido que deben existir "pooles" específicos de diacilglicéridos que son usados preferentemente para la síntesis de fosfatidiletanolamina o de TG. Por otro lado, es generalmente aceptado que las variaciones en CT son paralelas a las de los FL. Esto no coincide con lo observado en algunos estudios de nuestro equipo en ratas Wistar (Cava, 1986; Sánchez-Muniz, 1986; Cuesta y col., 1987a, 1987b; Viejo 1992).

Cuesta y col. (1987a) analizando el efecto sobre la lipemia de un aceite de oliva crudo y después de ser empleado en frituras sucesivas de patatas, observaron que la ingesta de un aceite usado respecto al crudo incrementaba significativamente el CT plasmático (21%) y el CE (33%) no afectándose significativamente las concentraciones de FL, si bien éstos tendían a incrementarse en el lote de aceite de fritura. En un estudio paralelo (Sánchez-Muniz y col., 1986) en el que se empleaba para freír patatas una grasa sólida (plantina) utilizada en industria alimentaria, se observó así mismo el efecto sobre la lipemia en ratas de dicha grasa sin usar y de la misma después de ser usada. La lipemia plasmática parecía seguir la misma secuencia que en la experiencia con aceite de oliva, ya que la ingesta de la grasa frita frente a la de la grasa cruda supuso una tendencia al incremento del CT y CE, con un incremento paralelo esta vez significativo de los FL. En ambos experimentos no se encontraron diferencias significativas en el CL al ingerir las grasas crudas o las procedentes de fritura.

En esta experiencia de Tesis Doctoral se observa una elevación del CL que es contrarrestada en parte por una elevación del CE, no encontrándose cambios en la concentración de FL (tabla 31).

De la comparación de estas tres experiencias surge la hipótesis de que al ingerir grasas utilizadas en fritura se produzcan modificaciones de la colesterolemia y fosfolipemia diferentes y en cierto modo opuestas. Así ante una mayor insaturación inicial de la grasa (aceite de girasol ó aceite de oliva) los cambios encontrados en la colesterolemia fueron significativos, pero no en la fosfolipemia. En el caso de la plantina (similar al aceite de palma, con una mayor saturación) no se encontraron diferencias en la colesterolemia, pero sí en la fosfolipemia.

El índice CT/FL (tabla 32) considerado como índice aterogénico (Kannel y col., 1971) disminuyó significativamente en el lote crudo respecto al basal ($0,61 \pm 0,03$ vs $0,74 \pm 0,02$).

En ratas normocolesterolémicas el cociente colesterol/fosfolípidos se mantiene por debajo de 1 (Cuesta y col., 1987b; Viejo, 1992), mientras que en casos de moderada y severa hiperlipemia, dicho índice es superior a la unidad (Mahley y Holcombe, 1977; Cava, 1986; Viejo, 1992).

Los datos de las tablas (31 y 32) señalan que a pesar del incremento moderado de la colesterolemia en el lote fritura 75 respecto al crudo, tales ratas deben considerarse atendiendo al cociente CT/FL como normocolesterolémicas.

5.2.8. Efectos sobre la lipoproteinemia de la incorpora - ción a la dieta de aceite de girasol "crudo" o utilizado en fritura frente a los valores inicia - les de un lote basal.

La reducción del CT en el lote crudo respecto al basal ya comentada, debe ser consecuencia de una modificación de las lipoproteínas.

En este estudio, tablas 33 y 34 y gráficas 31, 32 y 33 observamos que las VLDL del lote crudo tuvieron significativamente menos CT y CE que las VLDL del lote basal ($1,09 \pm 0,08$ vs $2,68 \pm 0,41$ mg/dl y $0,75 \pm 0,16$ vs $2,62 \pm 0,38$ mg/dl respectivamente). Así mismo, las LDL del lote que ingiere aceite crudo presentaron significativamente menos CT, CL y CE que las LDL del lote de referencia ($5,82 \pm 0,74$ vs $13,82 \pm 1,85$ mg/dl; $2,09 \pm 0,31$ vs $4,04 \pm 0,49$ mg/dl y $3,81 \pm 0,72$ vs $9,78 \pm 1,50$ mg/dl respectivamente; tabla 33 gráfica 32). En cuanto a las HDL de las ratas del lote crudo respecto a las HDL

basales también contienen significativamente menos CT, CL y CE, $53,39 \pm 2,91$ vs $67,58 \pm 5,18$ mg/dl, $46,15 \pm 3,32$ vs $55,85 \pm 4,45$ mg/dl y $7,24 \pm 0,91$ vs $11,73 \pm 1,17$ mg/dl respectivamente, tabla 33 gráfica 33).

Por tanto en este estudio la reducción del colesterol plasmático en el lote que ingiere aceite crudo es un reflejo de la reducción del CT en todas las lipoproteínas, VLDL, LDL y HDL.

A este respecto, la reducción de colesterol producida por la ingesta de PUFA n-6, según señala Shepherd y col. (1978) ocurre también a nivel de todas las lipoproteínas descendiendo sobre todo los niveles de LDL-colesterol, pero también los niveles de colesterol en VLDL y HDL, como ocurre en este mismo trabajo.

Esta disminución de HDL-colesterol ha sido descrita también por Vessby y col. (1980). Ellos sugieren que al no variar la relación LDL-colesterol/HDL-colesterol, el supuesto efecto beneficioso de los PUFA sobre la prevención de las enfermedades cardiovasculares, sería de menor cuantía. Hemos de señalar que cómo en este estudio, las experiencias de Vessby y col. (1980) se realizaron en periodos cortos de tiempo y con una ingesta elevada de PUFA. En experiencias más largas con ingestas menos elevadas de PUFA, Schwandt y col. (1982), obtuvieron un balance más favorable LDL-colesterol/HDL-colesterol.

Por otro lado Lock y col. (1983) sugieren que los bajos niveles de LDL-colesterol obtenidos tras la ingesta de PUFA son protectores de la aterosclerosis a pesar de la disminución de los niveles de HDL-colesterol.

Se ha propuesto que el efecto reductor de los niveles de VLDL remanentes y LDL de los PUFA n-6 sería a través de promover un incremento de la síntesis de receptores para Apo B-E en el hígado (Nestel, 1987), mientras que la reducción de la síntesis de HDL se debería a mecanismos que interferirían la síntesis de apoproteínas de las HDL (principalmente Apo AI) a nivel del hígado o intestino (Shepherd y col., 1978; Castro, 1986).

También, se ha descrito así mismo el papel clave de la LCAT en el transporte inverso del colesterol (Steinberg, 1987). En ratas concretamente la actividad LCAT parece condicionar, como ya indicamos, la esterificación del colesterol plasmático y el transporte de este CE al hígado, al ser captado directamente de las HDL por dicho órgano (Glass y col., 1983). Es por este camino precisamente por el que la rata captaría este CE, al no existir, o existir en cantidad minoritaria, en esta

especie la proteína transportadora de lípidos y estar por ello inhibida o muy disminuída la transferencia de CE a VLDL o IDL, con la posterior captación de estas partículas por el hígado a través de los correspondientes receptores de las mismas y con ello la subsiguiente eliminación de este CE a través de este órgano.

Analizadas las concentraciones de FL y TG (tablas 33 y 34 y gráficas 31, 32 y 33) observamos que en las VLDL y HDL de las ratas del lote crudo con respecto a estas mismas lipoproteínas del lote basal, tienen significativamente más TG ($11,39 \pm 1,81$ vs $4,56 \pm 0,48$ mg/dl y $10,98 \pm 1,13$ vs $7,49 \pm 0,50$ mg/dl respectivamente), mientras que las LDL de ambos lotes (tabla 33, gráfica 32) tienen iguales concentraciones de TG. Los FL tienden a incrementarse pero no significativamente en las VLDL y HDL del lote crudo frente a las VLDL y HDL del lote basal de referencia (tabla 33, gráficas 31 y 33), mientras que bajan significativamente en las LDL del lote que ingiere aceite crudo frente a la concentración de FL en las LDL del lote basal ($3,25 \pm 0,54$ vs $8,79 \pm 0,72$ mg/dl respectivamente, (tabla 33, gráfica 32).

El enriquecimiento en TG de las VLDL del lote crudo, como lo denota la modificación significativa del índice CT/TG (tabla 38, gráfica 42), el mayor porcentaje de TG en las VLDL (tabla 35 y gráfica 34) y el transporte relativo de TG por las VLDL (tabla 36 y gráfica 41), sugiere la expansión del tamaño de la zona central de estas VLDL respecto al lote basal. Sin embargo dicho enriquecimiento sería ampliamente compensado por un contenido significativamente menor de CE (tablas 35, 36 y 38 y gráficas 34, 41 y 42) que explicaría las diferencias significativas del índice CL + FL/CE + TG encontradas entre el lote basal y el lote crudo. El alto contenido de CE y moderado de TG en las VLDL del lote basal sugiere netas diferencias en su metabolización respecto a las VLDL del lote crudo, ya que como se ha comentado en la Revisión Bibliográfica el sustrato de la LPL son los triglicéridos de tales lipoproteínas.

Por otra parte, como hemos comentado, las dietas con mayor contenido lipídico motivan el aumento de la síntesis hepática de triacilglicéridos los cuales podrían contribuir al incremento del contenido de las VLDL plasmáticas.

La masa lipídica de las VLDL obtenida sumando CT + FL + TG del lote basal fue mucho menor que la del lote crudo ($8,65$ mg/100 ml vs $15,20$ mg/100 ml ó $0,14$ mmol/l vs $0,20$ mmol/l), principalmente en forma de TG, lo que está de acuerdo con el posible aumento de la síntesis de TG y VLDL como respuesta al mayor contenido lipídico de las

dietas.

De igual forma el grado de metabolización de las LDL debe ser diferente en el lote basal y crudo, dado el enriquecimiento porcentual en TG y el empobrecimiento en FL y CE en este último lote (tabla 35, gráfica 35), que induce cambios significativos del cociente $CL + FL/CE + TG$ y de los otros índices estudiados, (tabla 38, gráfica 43).

Las HDL de ambos lotes, crudo y basal presentaron menores diferencias aunque fue notable el enriquecimiento porcentual de TG y el empobrecimiento porcentual de CE de las HDL del lote basal respecto a las del lote crudo (tabla 35, gráfica 36) que implicó cambios no significativos entre el cociente $CL + FL/CE + TG$ de ambos lotes (tabla 38, gráfica 44).

Al comparar la composición de las VLDL del lote fritura 75 con las VLDL del lote aceite crudo (tablas 33 y 34 y gráfica 31) no se observaron diferencias significativas en el CT ($1,31 \pm 0,17$ vs $1,09 \pm 0,08$ mg/dl), en el CL ($0,47 \pm 0,13$ vs $0,44 \pm 0,15$ mg/dl) ni el CE ($0,81 \pm 0,15$ vs $0,75 \pm 0,16$ mg/dl). Tampoco se ven diferencias significativas en las concentraciones de FL ($1,79 \pm 0,43$ vs $2,72 \pm 0,70$ mg/dl) ni en los TG ($11,48 \pm 1,61$ vs $11,39 \pm 1,81$ mg/dl).

Estos valores sugieren una gran similitud entre las VLDL del lote crudo y frito que se confirma al comparar la composición lipídica porcentual de ambas VLDL (tabla 35, gráfica 34), $2,29 \pm 0,58\%$ vs $3,82 \pm 0,91\%$ de CL, $5,08 \pm 0,49\%$ vs $5,00 \pm 0,61\%$ de CE, $15,61 \pm 0,89\%$ vs $14,41 \pm 1,48\%$ de FL y $77,17 \pm 2,51\%$ vs $76,82 \pm 3,42\%$ de TG, y los cocientes CT/FL, CT/TG, $CL + FL/CE + TG$ y CE/CTx100 (tabla 38, gráfica 42).

Tal similitud de composición y por tanto de tamaño, implicaría un grado de metabolización equivalente entre las VLDL del lote crudo y frito.

A este respecto se ha propuesto que la rata dispone de un potente mecanismo para regular la subida de colesterol, el cual se realizaría a través de la captación rápida de sus VLDL evitando la permanencia de colesterol en plasma en forma de LDL. Esto explica los bajos niveles de LDL encontrados en la rata en éste y otros experimentos (Eisenberg, 1976; Sánchez-Muniz, 1986; Cuesta y col., 1987a). La masa lipídica de las VLDL del lote frito fue de 14,58 mg/dl ó 0,18 mmol/l frente a los 15,20 mg/dl o 0,20 mmol/l del lote crudo, lo que sugiere que las ratas de nuestra experiencia pueden utilizar dicho mecanismo para regular el incremento de colesterol producido, ya comentado.

Debido a tal similitud, creemos que las consideraciones utilizadas en la discusión de las VLDL del lote basal y crudo serían por tanto válidas para poder explicar las diferencias encontradas entre las VLDL de los lotes basal y frito (tablas 33, 34, 35, 36 y 38, gráficas 31, 34, 38 y 44).

Respecto a las LDL, los tres lotes parecen presentar diferencias.

Así al comparar las LDL del lote fritura 75 frente a los LDL del basal (tablas 33 y 34, gráfica 32) se encontraron disminuciones significativas en el contenido de CT ($8,91 \pm 0,36$ vs $13,82 \pm 1,18$ mg/dl), CL ($3,04 \pm 0,49$ vs $4,04 \pm 0,49$ mg/dl), permaneciendo los TG sin modificación ($4,96 \pm 0,65$ vs $5,35 \pm 0,61$ mg/dl).

El efecto de la fritura sobre las LDL (tablas 33, 34, gráfica 32) se manifestó en una tendencia a incrementarse las concentraciones en el lote fritura 75 respecto al crudo en el CT ($8,91 \pm 0,36$ vs $5,82 \pm 0,74$ mg/dl), CE ($6,28 \pm 1,10$ vs $3,81 \pm 0,72$ mg/dl) y el CL ($3,04 \pm 0,49$ vs $2,09 \pm 0,31$ mg/dl). No se observaron diferencias a nivel de FL ni de TG.

Es decir, en cuanto al contenido absoluto de CT, CL y CE, la fracción LDL del lote fritura 75 presenta niveles intermedios entre el lote basal y lote crudo, lo que sugiere al menos en parte una aminoración del efecto hipocolesterolemizante de los PUFA n-6 por efecto de la fritura. A este respecto no debemos olvidar la pérdida del contenido de ácido linoléico que se produce en el aceite de girasol por efecto de la fritura ya discutida en el apartado 5.1.4.3.

Estos resultados encuentran explicación al conocer la composición lipídica de las LDL de los 3 lotes (tabla 35, gráfica 35). Como ya se comentó, las LDL del lote crudo transportan más TG y menos CE y FL, pero igual porcentaje de CL que las del lote basal. Por su parte, las LDL del lote fritura 75 transportan igual porcentaje de CL y CE que las LDL del lote basal, pero muy diferentes de FL ($18,96 \pm 1,93$ vs $31,80 \pm 1,12\%$) y TG ($30,18 \pm 3,35$ vs $19,33 \pm 1,24\%$).

La composición lipídica porcentual de las LDL del lote frito respecto a las LDL del lote crudo (tabla 35, gráfica 35) indica un aumento significativo del CE a costa de los FL y TG que tienden a disminuir.

El cociente $CL + FL/CE + TG$ (tabla 38, gráfica 43), como ya se ha comentado fue mayor en los lotes crudo y fritura 75 que en el lote basal, lo que sugiere que las

LDL de los lotes crudo y fritura 75 son mayores y más metabolizables que las del lote basal.

Las LDL del lote fritura 75 presentaron un cociente $CL + FL/CE + TG$ equivalente a las de lote crudo lo que podría sugerir a su vez un tamaño y grado de metabolización equivalente, sin embargo las LDL del lote crudo parecen, por su contenido en CE y TG, más inmaduras y por tanto mayores que las del lote fritura 75.

Respecto a las HDL, ya comentamos que la transferencia de las ratas consumiendo dieta basal a la dieta conteniendo aceite de girasol supuso, probablemente debido al consumo de altas cantidades de linoléico, un descenso de los niveles de CT, CL y CE, no afectándose los FL e incrementándose los TG (tabla 33 y 34, gráfica 33).

La transferencia de la dieta basal a la dieta fritura 75 se manifestó en un mantenimiento de los niveles de CT en las HDL a costa de disminuir el CL ($11,73 \pm 1,17$ vs $7,87 \pm 1,08$ mg/dl), (tabla 33, gráfica 33), lo que repercutió en la variación significativa en las HDL del cociente $CE/CT \times 100$ ($82,59 \pm 1,26$ vs $97,71 \pm 4,61$), CT/FL ($0,74 \pm 0,02$ vs $0,62 \pm 0,04$) y CT/TG ($9,09 \pm 0,00$ vs $5,99 \pm 0,57$) (tabla 33 y gráfica 44). Estos resultados implican que el efecto del aceite de girasol crudo disminuyendo los niveles de HDL-colesterol, se pierde al utilizar aceite de girasol frito.

Al estudiar el efecto neto de la fritura sobre las HDL observamos en la tabla 33 y gráfica 33, que la fracción de HDL del lote fritura 75 respecto a las del lote crudo contiene significativamente más CT ($68,73 \pm 4,35$ vs $53,39 \pm 2,91$ mg/dl), CE ($60,86 \pm 4,49$ vs $46,15 \pm 3,32$ mg/dl) y FL ($111,02 \pm 4,70$ vs $95,04 \pm 4,77$ mg/dl) no variando el CL y presentando una tendencia a incrementarse los TG (tabla 33, gráfica 33). Estos resultados se manifiestan sólo en cambios significativos en el índice $CE/CT \times 100$ ($97,71 \pm 4,61$ vs $85,98 \pm 1,84$; tabla 38, gráficas 44 y 45).

Este hecho pudiera estar relacionado con el incremento de la transesterificación plasmática por la LCAT, ya que el sustrato de este enzima es la HDL. A este respecto Fielding y Fielding (1971) (citado por Rodríguez, 1981) demostraron que la LCAT reacciona directamente con el CL y fosfatidilcolina transportados por las HDL y sólo indirectamente con el CL y fosfatidilcolina de las VLDL, debido al rápido equilibrio que existe entre las diferentes lipoproteínas. Hermus (1975) y Lacko y col. (1974) señalaron así mismo que la LCAT ayuda a mantener la relación superficie/parte central (parte polar/parte no polar) de las VLDL

indicando que el aumento del flujo del CL y Lecitina desde VLDL a HDL contribuye a la cifra de esterificación de CL.

Más recientemente se ha descrito el papel clave de la LCAT en el transporte inverso del colesterol (Steinberg, 1987). En ratas la actividad LCAT parece condicionar la esterificación del colesterol y el transporte de este CE al hígado por medio de las HDL ya que ha sido demostrado en la rata "in vivo" una captación incrementada por el hígado de los ésteres de colesterol (EC) de la HDL (Glass y col., 1983). Es por este camino precisamente por donde la rata captaría el CE al no existir en esta especie la proteína transportadora de lípidos y estar por ello inhibida la transferencia de CE a VLDL o IDL con la posterior captación de estas partículas por el hígado y con ello la subsiguiente eliminación de colesterol a través de este órgano.

En estudios previos Sánchez-Muniz y col. (1986) y Cuesta y col., (1987a) encontraron que elevaciones muy moderadas de la colesterolemia en ratas conllevaban incrementos paralelos de los EC y HDL-colesterol y disminución de TG no encontrándose prácticamente variaciones en las fracciones de VLDL y LDL.

El estudio del transporte relativo de lípidos por las HDL (tabla 35 y gráfica 36) señala similitudes entre los 3 lotes con un predominio del contenido de FL en las HDL (mayor de 55%). No obstante, las HDL del lote basal contienen respecto a los otros dos lotes porcentualmente más CL y menos TG, lo que podría sugerir ciertas pequeñas diferencias metabólicas.

El estudio estadístico de la composición lipídica de las HDL del lote crudo y fritura 75 (tabla 35) no denotó diferencias significativas lo que sugiere un tamaño de partícula similar.

Teniendo en cuenta que la fracción HDL del lote fritura 75 respecto al lote crudo tiende a transportar mayor cantidad de todos sus lípidos, y que como acabamos de indicar tales HDL presentan una composición lipídica y tamaño equivalentes, parece claro que esto es debido a un aumento del número de partículas HDL en el lote fritura 75 que garantizaría un transporte inverso incrementado de colesterol al hígado, evitando por tanto, el incremento masivo de colesterol plasmático (Glass y col., 1983 y Steinberg, 1987).

Por otra parte, en la (tabla 36 y gráficas 37-41) se observa la distribución porcentual de los diferentes lípidos en las respectivas lipoproteínas.

Se puede comprobar que en rata las HDL son las partículas que vehiculizan mayoritariamente todos los lípidos, seguida en importancia por las LDL, excepto para los TG que se realiza por las VLDL.

Dados los niveles de TG tan reducidos encontrados en los 3 lotes de esta experiencia y la presencia mayoritaria de HDL en la rata, no es de extrañar que los niveles de VLDL y por tanto la cantidad de TG transportada por las VLDL respecto al total de TG sean tan bajos (tabla 37). Esta situación es más palpable en el lote basal donde los niveles de TG totales fueron de $17,90 \pm 1,75$ mg/dl siendo de ellos transportados por las VLDL sólo $4,56 \pm 0,43$ mg/dl.

Resultados similares han sido encontrados en chicas jóvenes de nuestro Departamento (datos no publicados) que presentaban niveles muy reducidos de TG totales, y en las que la preponderancia en el transporte de TG por las VLDL no se presentaba.

El transporte mayoritario de lípidos de las HDL se corresponde con el diferente patrón lipoproteico de la rata respecto a los humanos. En dicho animal las lipoproteínas mayoritarias son las HDL (70-80%), seguidas muy de lejos por las VLDL (15-20%) y las LDL (aprox. 6%) (Sánchez-Muniz y col., 1982, 1986; Cuesta y col., 1987a, 1987b y Viejo, 1992).

En el presente estudio, y relacionado con lo ya comentado, el protagonismo de las HDL en el transporte relativo de CT, CE y FL se hace aún más patente en los lotes crudo y fritura 75 que en el lote basal.

Este patrón lipoproteico de la rata tan distinto respecto al de humanos, responde a la diferente metabolización de las lipoproteínas.

En humanos, la mayor parte de las LDL se forman a partir de las VLDL, de aquí se deduce el interés de la determinación de niveles de LDL en plasma, sólo cuando está incrementada la síntesis de VLDL y la conversión de éstas en LDL. En rata sólo una pequeña proporción de las LDL proceden de las VLDL (Eisenberg y Levi, 1976) existiendo diferentes mecanismos en su metabolización, que determinan los niveles fisiológicamente bajos de las LDL plasmáticas. Por tanto quizás no sea trasladable a este animal la idea de Schonfeld y Witztum (1978) de que las LDL están relacionadas con niveles de colesterol y lesión aterosclerótica, pero sí la de Rhoads y col. (1978) (citados en el trabajo de Rodríguez, 1981) que relacionan un riesgo negativo con niveles altos de HDL colesterol ya que este animal, tiene elevados los niveles de HDL y presenta gran resistencia a la inducción en él

de lesiones ateroscleróticas (Wissler y Vesselinovitch, 1987). Tampoco en rata, por tanto, las LDL estarían relacionadas con los niveles de colesterol.

En resumen, después de la exhaustiva discusión de los resultados obtenidos en las diferentes lipoproteínas de las ratas estudiadas en esta experiencia, podemos concluir que los cambios encontrados fueron siempre más marcados entre el lote basal y los otros dos lotes, lo que debe relacionarse principalmente con la edad de los animales y la dieta consumida (particularmente con el contenido de grasa y por tanto de ácido linoléico). No obstante la ingesta de aceite de fritura frente al aceite crudo indujo un incremento significativo del CT, CL y CE sérico que se manifestó significativamente en un incremento del CT, CE y FL y del índice de esterificación del colesterol en las HDL. Dada la similitud de la composición lipídica de las HDL de ambos lotes ya discutida, parece claro que el incremento de los lípidos en la fracción de HDL se debería a un aumento del número de partículas.

Esto sería como ya se ha comentado, un sistema de regulación de la colesterolemia muy importante, relacionado con el transporte inverso de colesterol, que aseguraría la captación por parte del hígado de la rata de éstos ésteres de colesterol transportados por las HDL (Glass y col., 1983 y Steinberg, 1987).

La ingesta de aceite de fritura produjo VLDL, tanto cuantitativa como cualitativamente, similares a la de aceite crudo. La rápida aclaración hepática de las VLDL plasmáticas, evitando la subida del colesterol plasmático y su permanencia como LDL, sería un segundo mecanismo utilizado para regular la colesterolemia por el lote que recibe en su dieta aceite de girasol utilizado en 75 frituras.

No obstante, no debe olvidarse que otros factores pueden estar implicados en la metabolización de las lipoproteínas originadas tras la ingesta de grasas o aceites alterados por la fritura.

En el capítulo 5.1.4.4 se mostraron y comentaron con amplitud la aparición en las grasas de fritura de compuestos procedentes de la alteración termoxidativa y de la alteración hidrolítica, las cuales (principalmente los compuestos originados por la termoxidación) se acumulan en el aceite de la freidora. Estos compuestos se originan por la ruptura de los dobles enlaces de los correspondientes ácidos grasos que forman las diferentes grasas, originándose posteriormente las complejas reacciones de peroxidación y ciclación ya comentadas.

En este experimento, se observó el descenso significativo de ácido linoléico en la grasa de fritura con la formación de los correspondientes compuestos procedentes de la alteración termoxidativa e hidrolítica ya discutidos.

Se puede admitir que quizás las lipoproteínas de este estudio puedan ser lipoproteínas peroxidadas (lipoproteínas que contienen ácidos grasos peroxidados). Se ha descrito que estas lipoproteínas peroxidadas no son aclaradas por el plasma a través de sus receptores celulares que aclaran las lipoproteínas no peroxidadas, lo cual implica la inhibición de síntesis de colesterol endógeno celular, siendo aclaradas a través de células "scavenger" del hígado (Steinberg y col., 1989). La captación a través de esta vía no implica una inhibición de la síntesis de colesterol endógeno celular (Glomset y Norum, 1973) aumentando consecuentemente las cifras de colesterol.

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

La finalidad de esta memoria de Tesis Doctoral es doble, en primer lugar se planteó conocer el comportamiento de un aceite de girasol durante 75 frituras repetidas de patatas realizadas de forma sucesiva y discontinua con adición de aceite no usado.

En segundo lugar se estudiaron la aceptabilidad de dietas conteniendo aceite de girasol empleado en 75 frituras y aceite de girasol sin usar y sus efectos sobre crecimiento, ingesta, metabolismo lipídico hepático y metabolismo lipoproteico plasmático de ratas Wistar en crecimiento. Dichos efectos se compararon frente a datos basales de ratas alimentadas previamente con dieta estándar de laboratorio. A su vez se analizaron los posibles efectos tóxicos de dichas dietas.

Para cubrir el primer objetivo se frieron tandas de 500 gramos de patatas en 3 litros de aceite, adicionando cada 4-5 frituras aceite sin usar para reemplazar el aceite adsorbido por las patatas y completar el volumen de las freidoras a 3 litros y mantener así constante la relación patatas/aceite en las freidoras.

Se valoró el rendimiento del aceite de girasol en base al volumen de aceite gastado por fritura y freidora, así como la alteración del mismo. Para esto último se utilizaron índices clásicos como el de refracción, color, acidez, absorbancia específica a 270 nm. Se empleó la combinación de cromatografía en columna y cromatografía gaseosa para valorar los cambios en el contenido en ácidos grasos del aceite.

La alteración total (productos de alteración de triglicéridos) de los aceites no usado y usado, se evaluó mediante cromatografía en columna, utilizándose posteriormente la fracción alterada (más polar) para valorar el contenido de productos propios de la termoxidación y de la hidrólisis mediante la utilización de la cromatografía de alta eficacia de exclusión por tamaño de partícula.

Para la obtención del segundo objetivo, se prepararon dietas conteniendo como única fuente grasa aceite de girasol empleado en 75 frituras y aceite de girasol sin usar. El contenido de proteínas de dichas dietas fue del 14% y el de grasa del 15%.

Ratas basales Wistar macho de 65 gramos de peso, después de un periodo de adaptación de 4 días se sometieron durante 28 días a las dietas experimentales, valorándose la ingesta, el crecimiento, la eficacia alimentaria y el coeficiente de eficacia proteica. Después de 28 días las ratas se sacrificaron obteniéndose

el hígado y la sangre. En el hígado se realizó un estudio histológico, así como se determinó el contenido de humedad, grasa, colesterol, fosfolípidos, triglicéridos y porcentaje de ácidos grasos. De la sangre, tras su coagulación se obtuvo suero y se procedió a su ultracentrifugación y fraccionamiento en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL), determinándose en suero y lipoproteínas el contenido de colesterol libre, esterificado y total, de fosfolípidos y triglicéridos.

Los datos obtenidos se evaluaron estadísticamente, permitiendo emitir las siguientes conclusiones:

1) Sobre el rendimiento y alteraciones del aceite de girasol utilizado en 75 frituras repetidas de patatas de forma discontinua y con renovación adecuada con aceite fresco cada 4-5 frituras.

1.1.- El tiempo total de calentamiento del aceite puede estimarse en 25 horas y 10 minutos. El volumen de aceite añadido cada 4-5 frituras fue de 260,56 \pm 22,68 mililitros, lo que supone la adición de 4,5 litros a los 3 litros de partida para poder realizar 75 frituras repetidas de patatas.

1.2.- Si bien el índice de refracción del aceite de girasol no sufre modificaciones significativas durante las frituras, el índice de color, el índice de acidez y la absorbancia específica a 270 nm se incrementaron significativamente.

1.3.- El contenido de ácido linoléico del aceite de girasol disminuyó significativamente a partir de la fritura veinte siendo dicha disminución del 22,1% en la fritura 75.

1.4.- La alteración total dada como porcentaje de alteración de triglicéridos, fue del 5,09% en el aceite sin usar y se elevó de forma drástica y significativa durante las primeras veinte frituras, tendiendo a estabilizarse posteriormente en un nivel próximo al 19%, alcanzando un valor de 19,11% en la fritura 75.

1.5.- La valoración de la fracción polar mediante cromatografía de alta eficacia de exclusión por tamaño de partícula, indica una alteración preferentemente termoxidativa, observándose un

aumento lineal de los niveles de polímeros de triglicéridos hasta la fritura setenta y cinco, incrementándose los dímeros de triglicéridos de forma ostensible durante las primeras veinte frituras estabilizándose a partir de la fritura treinta hasta el final de la experiencia. Sin embargo los triglicéridos oxidados no sufren modificación a partir de la fritura veinte.

1.6.- La alteración hidrolítica producida durante las frituras sucesivas se incrementó hasta la fritura treinta, estabilizándose posteriormente. Dicha alteración hidrolítica se relaciona sólo con la formación de diglicéridos, ya que la cantidad de ácidos grasos libres permanece prácticamente sin cambiar durante todo el proceso de fritura. Por lo tanto la determinación de los ácidos grasos libres por cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión por tamaño de partícula puede no ser un buen indicador del grado de deterioro de una grasa empleada en frituras.

1.7.- Es de destacar las elevadas correlaciones encontradas entre la alteración total y el contenido de triglicéridos oxidados, de dímeros y polímeros de triglicéridos. Por tanto si se trata de definir la alteración de un aceite de girasol sometido a frituras repetidas es equivalente hablar de contenido polar que de alteración termoxidativa. No obstante desde el punto de vista nutricional, es importante saber que tipo de compuestos de alteración termoxidativa y en qué porcentaje (sobre todo de dímeros) forman la fracción polar.

1.8.- Destacan, a su vez, las elevadas correlaciones entre los valores obtenidos por los distintos índices de carácter general y por los métodos cromatográficos. La concentración de ácido linoléico correlacionó negativa y significativamente con el número de frituras, el porcentaje de compuestos polares y el contenido de compuestos de alteración termoxidativa.

2.- Referente a los efectos sobre ingesta, crecimiento e hígado de la rata, del consumo de dietas conteniendo aceite de girasol utilizado en 75 frituras repetidas de patatas con un 19,11% de productos de alteración (lote fritura 75) y de dietas conteniendo aceite de girasol sin usar con un 5,09% de productos de alteración (lote crudo) respecto a otra estándar de laboratorio (lote basal).

2.1.- El grado de alteración del aceite de girasol utilizado en las dietas no afectó significativamente a la aceptabilidad de las mismas, no variando la ingesta total dietaria ni la de grasa o proteína. Sin embargo, el peso final de las ratas del lote fritura 75 fue un 12% menor que el del lote crudo. Por tanto, el coeficiente de eficacia alimentaria (CEA) y el coeficiente de eficacia proteica (PER) se vieron significativamente disminuidos.

2.2.- El incremento ponderal hepático encontrado en los lotes crudo y fritura 75, respecto al lote basal, fue similar.

Sin embargo las ratas del lote fritura 75 presentaron el mayor índice hepatosomático debido al menor peso de tales animales.

2.3.- Los hígados del lote fritura 75 tuvieron el mayor porcentaje de grasa y el menor de humedad. El lote crudo presentó el mayor contenido de fosfolípidos.

2.4.- El contenido hepático de ácidos grasos monoinsaturados y ácido linoléico fue más elevado en el lote crudo que en el basal, mientras que el de ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3 fue menor en los lotes crudo y fritura 75 que en el lote basal.

Cuando se comparan los lotes crudo y fritura 75 se encontró una gran similitud en el contenido de todos los ácidos grasos y familias de ácidos grasos excepto en el contenido más elevado de ácido araquidónico en el lote fritura 75.

2.5.- El cociente C20:4/C18:2 índice de las actividades Delta 5-desaturasa elongasa y Delta 6-desaturasa, fue menor en el lote crudo que en el de fritura 75 y en éste, a su vez, menor que en el basal.

2.6.- El estudio histológico revela, que mientras los hígados del lote basal tuvieron

características de normalidad, los del lote crudo presentaron procesos degenerativos catalogables de muy ligeros ó ligeros, acompañados de áreas de regeneración, ambos propios de células sometidas a niveles de peroxidación lipídica moderada. Por su parte las alteraciones degenerativas hepáticas en el lote fritura 75 fueron mucho más marcadas y están relacionadas con el nivel elevado de polares del aceite de girasol y con el posible efecto tóxico inducido por la sinergia de los antioxidantes BHT y BHA presentes en tal dieta.

3.- Referente a los efectos sobre la lipemia y lipoproteinemia de ratas, del consumo de dietas conteniendo aceite de girasol utilizado en 75 frituras repetidas de patatas con un 19,11% de productos de alteración (lote fritura 75) y dietas conteniendo aceite de girasol sin usar con un 5,09% de productos de alteración (lote crudo) respecto al de una dieta estándar de laboratorio (basal).

3.1.-Las ratas del lote crudo presentaron unas concentraciones significativamente menores de colesterol total, colesterol libre y colesterol esterificado que el lote basal, atribuible al mayor consumo de grasa y ácido linoléico.

Dicho descenso es reflejo de la disminución observada en la concentración de estos lípidos en las VLDL, LDL y HDL.

3.2.- El efecto hipocolesterolemia observado al administrar aceite de girasol sin usar, se anula al administrar aceite de girasol utilizado en frituras, produciéndose un incremento de colesterol total y esterificado en las HDL del lote fritura 75 respecto a las HDL del lote crudo. Este hecho se relaciona con el descenso producido de ácido linoléico en el aceite de girasol durante las frituras repetidas.

3.3.- El incremento de triglicéridos plasmáticos en el lote crudo respecto al basal se debe a su mayor edad y mayor cantidad de grasa consumida y es reflejo del incremento de triglicéridos en las VLDL y HDL de aquel lote. Dicho efecto se mantiene respecto al lote basal en las ratas del lote fritura 75.

3.4.- En los tres lotes, debido al patrón lipoproteico de la rata, es con mucho la HDL la principal vehiculadora de lípidos, seguida en importancia por la LDL, excepto para los

triglicéridos que se realiza por las VLDL.

3.5.- La composición media de las VLDL del lote fritura 75 es similar a las del lote crudo, lo que implica un grado de metabolización equivalente entre ambas VLDL. Dichas VLDL tuvieron un contenido mayor en triglicéridos y menor en colesterol esterificado que las VLDL del lote basal.

3.6.- Las LDL de los tres lotes presentaron diferencias netas. Así el porcentaje de colesterol libre y colesterol esterificado de las LDL del lote basal y lote fritura 75 fue similar, pero los porcentajes de triglicéridos y fosfolípidos fueron muy diferentes.

Por el contenido de triglicéridos, las LDL del lote crudo y fritura 75 parecen mayores y más metabolizables que las del lote basal, mientras que las del lote crudo por su contenido en triglicéridos y colesterol esterificado serían mayores y más inmaduras que las del lote fritura 75.

3.7.- Las HDL de las ratas de los lotes crudo y fritura 75 debido al mayor consumo absoluto de grasa y ácido linoléico fueron muy similares y contenían menor cantidad de colesterol libre y mayor de triglicéridos que las HDL del lote basal.

Por tanto el incremento de colesterol total, triglicéridos y fosfolípidos en las HDL del lote fritura 75 respecto al lote crudo, está relacionado con un incremento en el número de partículas HDL y no con cambios en la composición lipídica.

3.8.- La elevación del colesterol total en la fracción HDL de las ratas del lote fritura 75 respecto al lote crudo se produce a expensas de la elevación del colesterol esterificado y del índice de esterificación.

CONCLUSION GENERAL

En 75 frituras de patatas con aceite de girasol realizadas de forma discontinua y con reposición adecuada del volumen de aceite de la freidora domina la alteración termoxidativa sobre la hidrolítica, manteniéndose la alteración total del aceite por debajo del límite que marca la legislación vigente.

Los efectos hipocolesterolemiantes de una dieta conteniendo aceite de girasol no usado respecto a una dieta estándar de laboratorio se pierden al incluir en la dieta aceite de girasol utilizado en 75 frituras de patatas. El incremento de la colesterolemia observado en el lote que recibe aceite usado es reflejo del incremento del colesterol total y esterificado de las lipoproteínas de alta densidad.

Las lesiones histológicas encontradas en los hígados sugieren la necesidad de plantear un mayor número de estudios para valorar la toxicidad de los productos de alteración del aceite de girasol, así como para analizar la posible toxicidad derivada de la utilización conjunta de BHT y BHA en dietas que contienen altos niveles de grasas peroxidadas.

7. BIBLIOGRAFIA

- AITZEMULLER, K. (1973a). Frontal elution liquid chromatography of a "total artefacts" peak in frying oils. J. Chromatogr., 79, 329-334.
- AITZEMULLER, K. (1973b). Investigation of heated and oxidized oils and fats by gradient elution liquid chromatography. J. Chromatogr., 83, 461-469.
- AITZEMULLER, K. (1975). The liquid chromatography of lipids. A critical review. J. Chromatogr., 113, 231-266.
- AITZEMULLER, K. (1988). HPLC in the oils and fats laboratory. Chemistry and Industry, 452-465.
- AITZEMULLER, K. y GUHR, G. (1976). Die flüssig chromatographische bestimmung der unveränderten triglyceride in gebrauchten bratfetten. Fette Seifen Anstrichmittel, 78, 83-88.
- ALEXANDER, J.C. (1966). Effect of diet handling on nutritional studies with used frying fats. Lipids, 1, 254-257.
- ALEXANDER, J.C. (1978). Biological effects due to changes in fats during heating. J. Am. Oil Chem. Soc., 55, 711-717.
- ALIM, H. y MORTON, I.D. (1974). Oxidation in foodstuffs fried inedible oils. IV International Congress on Food Science and Technology, I, 345-356.
- ALPERS, D.H.; LOCK, D.R.; LANCASTER, N.; POKSAY, K y SCHONFELD, G. (1985). Distribution of apolipoprotein A-I and B among intestinal lipoproteins. J. Lip. Res., 26, 1-10.
- ANCIN, M.C.; MARTINES, M.T. (1991). Estudio de la degradación de los aceites de oliva sometidos a fritura. Determinación estadística del parámetro que mejor cuantifica esta degradación. Grasas y Aceites, 42, 22-31.
- ANDERSON, R.G.W.; GOLDSTEIN, J.L. y BROWN, M.S. (1976). Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. Proc. Nat. Acad. Sci., USA 73, 2434.

- ANDERSON, L.; DIBBLE, M.V.; TURKKI, P.R.; MITCHELL, H.S. y RYNBERGEN, H.J. (1987). Utilización de nutrientes: digestión, absorción y metabolismo. En: "Nutrición y dieta de Cooper". 17 edición. J.B. Lippincott Co. Interamericana. México. pp. 175-212.
- A.O.A.C. (1975). Association of Official Analytical Chemists "official Methods of analysis", 12ª ed. Association of official analytical chemist's. Washigton, 15-17.
- AUGUSTIN, M.A. y BERRY, S.K. (1983). Efficacy of antioxidants BHA and BHT in palm olein during heating and frying. J. Am. Oil Chem. Soc., 60, 1520-1523.
- ARROYO, R. (1991). Estudio de la calidad del aceite extraído de patatas fritas en aceite de girasol. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense, Madrid.
- ARROYO, R.; CUESTA, C.; GARRIDO-POLONIO, C.; LOPEZ-VARELA, S.; SANCHEZ-MUNIZ, F.J. (1992). High-Performance size exclusion chromatographic studies on polar components formed in sunflower oil used for frying. J. Am. Oil. Chemists' soc., 69, 1-7.
- ARTMAN, N.R. (1969). The chemical and biological properties of heated and oxidized fats. Advances in Lipid Research. Ed. D. Kritchevsky y A. Paleotti, Academic press, New York, pp. 245-251.
- ARTMAN, N.R. y ALEXANDER, J.C. (1969). Characterization of some heated Fat components. J. Am. Oil Chem. Soc., 45, 643-648.
- BARKER, M.O. y BRIEN, M. (1975). Mechanisms of lipid peroxidation in erythrocytes of vitamin E-deficient Rats and in phospholipid Model systems. Arch. Biochem. Biophys., 166, 32-40.
- BARTER, P.J. y LALLY, J.I. (1978). The activity of an esterified cholesterol transferring factor in human and rat serum. Biochem. Biophys. Acta, 531, 233-236.
- BERNADIER, C.D. (1988). Interaction of insulin status and dietary fat on the hepatic phospholipid fatty acid composition of BHT rats. Nutr. Rep. Int., 37, 269-276.
- BEYNEN, A.C. (1988). Dietary monounsaturated fatty acids and liver cholesterol. Artery, 15, 170-175.

- BEYNEN, A.C.; ENGELSMAN, G.; SCHOLZ, K.E. y WEST, C.E. (1983). Casein-induced hypercholesterolemia in rabbits: distribution of cholesterol, triglycerides and phospholipids between serum and liver. *Ann. Nutr. Metab.*, 27, 117-124.

- BEYNEN, A.C. y KATAN, M.B. (1985). Why do polyunsaturated fatty acids lower serum cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.*, 42, 560-563.

- BILLEK, G. (1980). Heated oil-chemistry and nutritional aspects, En: "Lipids and Lipoproteins". Proceedings of a Scientific Symposium of the International Federation of Margarine Associations, (ed. Fondu, M.), Brussels, May 17-18, 1979. *Nutr. Metab.*, 24 (suppl.1). pp. 200-210.

- BILLEK, G. (1985). Heated fats in the diet, En: "The Role of Fats in Human Nutrition", ed. Padley, F.B. and Podmore, U., Ellis Horwood, Chichester, pp. 163-171.

- BILLEK, G., GUHR, G. y WAIBEL, J. (1978). Quality assesment of used frying fats: a comparison of four methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 55, 728-733.

- BLIGH, E.G. y DYER, W.I. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917.

- BLUMENTHAL, M.M. (1987). Optimum Frying: Theory and practice. Monograph. Series, Libra Laboratories, Inc.; Piscataway, N.J.

- BLUMENTHAL, M.M. (1991). A new look at the chemistry and physic of deep-fat-frying. *Food Technol.*, 45, 68-71.

- BLUMENTHAL, M.M. y STOCKLER, J.R. (1986). Isolation and detection of alkaline contaminant materials (A.C.M) in used frying oils. *J. Am. oil. Chem. soc.*, 63, 687-692.

- BOCHENEK, W y RODGERS, J.B. (1978). Effects of saturated and unsaturated fats given with and without dietary cholesterol on hepatic cholesterol synthesis and hepatic lipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, 528, 1-16.

- BOELHOWVER, C., KNEGTEL, J. Th. y TELS, M. (1967). On the mechanism of the termal polymerization of linseed oil. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 69, 432-436.

- BONANOME, A. y GRUNDY, S.M. (1988). Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *N. Engl. J. Med.*, 318, 1244-1248.
- BORTZ, W.M. (1973). On the control of cholesterol synthesis. *Metabolism*, 22, 1507-1512.
- BOSKOU, D. (1988). Stability of frying oils. En: "Frying of food. Principles, Changes, New Approaches". Ed. Ellis Horwood, Chichester, England, 174-185.
- BOSKOU, D. y MORTON, J.D. (1976). Effect of plants sterols on the rate of deterioration of heated oils. *J. Sci. Food Agric.*, 27, 928-932.
- BRACCO, U., DIEFFENBACHER, A. y KOLAROVIC, L. (1981). Frying performance of palm oil liquid fractions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58, 6-12.
- BRADLEY, W.A.; HWANG, S.L.C.; KARLIN, J.B.; LIN, A.H.; PRASAD, S.C.; GOTTO, A.M. Jr y GIANTURCO, S.H. (1984). Low density lipoprotein receptor binding determinants switch from apolipoprotein E to apoprotein B during conversion of hypertriglyceridemic very low density lipoproteins to low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, 259, 14728-14735.
- BRECKENRIDGE, W.C.; LITTLE, J.A.; STEINER, G.; CHOW, A. y POAPST, M. (1978). Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-II. *N. Engl. J. Med.*, 298, 1265.
- BRODNITZ, M. H., NAWAR, W.W. and FAGESRSON, I.S. (1968). Autoxidation of saturated fatty acids. II. The determination of the site of hidroperoxide groups in autoxidizing methyl palmitate. *Lipids*, 3, 65-71.
- BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L.; FREDRICKSON, D.S. (1983). Familial type 3 hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia). En: "The metabolic basis of inherited disease". Stanbury, J.B.; Wyngaarden, J.B.; Fredrickson, D.S.; Goldstein, J.L. y Brown, M.S. eds. McGraw-Hill. New York. Chapter 32.
- BROWN, M.S. y GOLDSTEIN, J.L. (1984). How L.D.L. receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci. Amer.*, 251, 52-60.
- BUCKO, A., SIMKO, V., ONDREICKA, R., y BABALA, J. (1969). Les modifications chimiques et physiques et l'influence biologique des graisses alimentaires traitées par chauffage, 1st International Congress on Biological Value of Olive Oil, Lucca (Italy), pp. 97-107.

- **BULL. LAB. COOP. 95390. SAINT PRIX (1983).**
Aimez-vous les frites; 149, 1-5.
- **CANELLA, M. y COOPER, A.D. (1979).** High affinity binding of chylomicron remnants to rat liver plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 76, 338.
- **CARLSON, L.A. y BALLANTYNE, D. (1976).** Changing relative proportion of apolipoprotein C-II and C-III of very low density lipoprotein in hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*, 23, 563-568.
- **CASTANG, J. (1981).** Etude sui les huile de fritures. Caracteres analytiques et projet de reglementation *Ann. Falsif. Expert. Chim.*, 74, 701-708.
- **CASTELLON, A. (1989).** Determinación rápida de sustancias polares y polímeros en aceites recalentados por cromatografía gaseosa cuantitativa. *Grasas y Aceites*, 40, 356-363.
- **CASTRO TOLEDO, A. (1986).** Prevalencia de algunos factores de riesgo coronario en un colectivo de adolescentes de la comunidad de Madrid. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
- **CAUSERET, J. (1982).** Chauffage des corps gras et risques de toxicité. *Cashier Nutr. Diet.* 17, 19-30.
- **CAUSERET, J.; POTTEAU, B. y GRANDGIRARD, A. (1978).** Contribution a l'etude des effects physiopathologiques de l'ingestión d'huiles chauffées chez le rat. *Ann. Nutr. Alim.*, 32, 483-497.
- **CAVA, F. (1986).** Inducción de hipercolesterolemia en ratas. Su prevención mediante consumo de sardinas fritas en aceite de oliva. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
- **CHAJEK, T. y EISENBERG, S. (1978).** Very low density lipoprotein metabolism of phospholipids, cholesterol and apolipoprotein C in the isolated perfused rat heart. *J. Clin. Invest.*, 75, 4519.
- **CHANG, S.S y MONE, P.E. (1969).** Breakdown inhibitors, En: "Food Procesing Review", nº 5 Ed. Bednarcyck, Noyes Development Corporation, New Yersey. PP 209-211.
- **CHANG, S.S.; PETERSON, R.J. y CHITANG, H.O. (1978).** Chemical reactions involved in the deep fat frying of foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 55, 718-727.

- CHAPMAN, M.J. y MILLS, G.L. (1977). Characterization of the serum lipoprotein and their apoproteins in hypercholesterolemic guinea pigs. *Biochem. J.*, 167, 9-21.
- CHEN, C y SHAW, Y.S. (1974). Cyclic metabolic pathway of butylated hydroxytoluene by rat liver microsomal frations. *Biochem. J.*, 144, 497-502.
- CHRISTOPOULOU, C.N. y PERKINS, E.G. (1986). High performance size exclusion chromatography of fatty acids, mono-, di- and triglyceride mixture, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 63, 679-686.
- CHRISTOPOULOU, C.N y PERKINS, E.G. (1989). Isolation and characterization of dimers formed in used soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66, 1360-1370.
- CLARK, W.L. (1976). Nutritional aspects of frying fats: An overview. Presented at 50th Annual Meeting. *Am. Oil. Chem. Soc.*, Chicago, Sept. 26-29.
- CLARK, W.L.; SERBIA, G.W. (1991). Safety aspects of frying fats and oils. *Food Technol.*, 45, 84-89.
- COLL HELLIN, L. y RUEDA CLAUSELL, M.P. (1984). Incidencias de la fritura en la composición de la fracción lipídica de diversos aperitivos de consumo generalizado en nuestro país. *Anal. Bromatol.*, 36, 33-60.
- COMBE, N.; CONSTANTIN, M.J. y ENTRESSANGLES, B. (1981). Lymphatic absorption of nonvolatile oxidation products of heated oils in the rat. *Lipids*, 16, 8-12.
- COOPER, A.D. (1976). The regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in the isolated perfused rat liver. *J. Clin. Invest.*, 59, 1461.
- CORNWELL, D.G. y PANGANAMALA, R.V. (1981). Atherosclerosis: an intracelular deficiency in essential fatty acids. En: "Essential fatty acids and protaglandins". Holman R.T., ed. *Progress in Lipid Res.* Pergamon Press. vol. 20.
- COWAN, J.C. (1961). Analyses of lipids and oxidation products by partition chromatography. Dimeric and polymeric products. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 38, 130-134.

- CRAMPTON, E.W., COMMON, R.H., FARMER, F.A., WELLS, A.F., CRAWFORD, D. (1953). Studies to determine the nature of the damage to the nutritive value of some vegetable oil from heat treatment, III. The segregation of toxic and nontoxic material from the esters of heat-polymerized linseed oil by distillation and by urea adduct formation. J. Nutr., 49, 333-346.
- CRAMPTON, E.W., COMMON, R.H., PRITCHARD, E.T., FARMER, F.A. (1956). Studies to determine the nature of the damage to the nutritive value of some vegetable oils from heat treatment, IV. Ethyl esters of heat-polymerized linseed, soybean and sunflower seed oils. J. Nutr., 60, 13-24.
- CUESTA, C.; SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; RODRIGUEZ, A. y VARELA, G. (1987a). Alteraciones fisicoquímicas de un aceite de oliva empleado en frituras repetidas y su incidencia sobre la lipoproteínemia de ratas. Rev. esp. Fisiol., 43, 51-56.
- CUESTA, C.; SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; RODRIGUEZ, A. y VARELA, G. (1987b). Effect on lipoproteinemia in rats fed diets containing either olive oil or a solid vegetable fat. Nutr. Rep. Int., 36, 483-489.
- CUESTA, C., SANCHEZ-MUNIZ, F.J. y VARELA, G. (1988). Nutritive value of frying fats. En: "Frying of food - Principles, Changes, New Approaches". eds. G. Varela, A.E. Bender y I.D. Morton. Ellis Horwood, Chichester, England, pp. 112-128.
- CUESTA y C., SANCHEZ-MUNIZ, F.J. y HERNANDEZ, I. (1991a). Evaluation of nonpolar methyl esters by column and gas chromatography for the assessment of used frying olive oils. J. Am. Oil Chem. Soc., 68, 443-445.
- CUESTA, C., SANCHEZ-MUNIZ, F.J., HERNANDEZ, I. y LOPEZ-VARELA, S. (1991b). Modificaciones de un aceite de oliva durante las frituras sucesivas de patatas. Correlaciones entre distintos índices analíticos y de evaluación global de la degradación, Rev. Agroquim. Tecnol. 31, 523-531.
- CUESTA, C., SANCHEZ-MUNIZ, F.J. (1991c). Tecnología de la fritura. Alteraciones de las grasas utilizadas en frituras debidas al proceso, tipo de grasa culinaria y alimento. Alimentación, equipos y tecnología. 4, 101-108.
- CUSTOT, F. (1959). Toxicité des graisses chauffées. Le problème des huiles de friture. Ann. Nutr. Alim, 13, A417-A448.

- DE GOETHART; F.R.L., HOECKMAN, H.; SINKELDAM, E; VAN GEMERT, L.J. Y HERMUS, R.J.J. (1985). Cooking in oil: the stability of frying oils with a high linoleic acid content. *Voeding*, 46, 300-310.

- DESAI, I.D.; TAPPEL, A.L. (1973). Damage to protein by peroxidized lipids. *J. Lip Res.*, 4, 204-207.

- DEUEL, H. J. Jr. (1955). The lipids. Their chemistry and biochemistry, En: VII Biochemistry, Interscience Publishers, New York, pp. 227-240.

- DEYKIN, D. y GOODMAN, D.S. (1962). The hydrolysis of long chain fatty acid esters of cholesterol with rat liver enzymes. *J. Biol. Chem.*, 237, 3649.

- DIAZ ALONSO, A.L. (1977). Contribución al estudio de las degradaciones experimentadas por los aceites en los procesos de fritura. I. Aceite de oliva. *Grasas y Aceites*, 28, 235-241.

- DOBARGANES, M.C.; PEREZ-CAMINO, M.C. y GUTIERREZ GONZALEZ-QUIJANO, R. (1984). Métodos analíticos de aplicación en grasas calentadas. I. Determinación de ésteres metílicos no alterados. *Grasas y Aceites*, 35, 172-177.

- DOBARGANES, M.C.; PEREZ-CAMINO, M.C. (1985). Métodos analíticos de aplicación en grasas calentadas. III. Evolución de los ácidos grasos e influencia de su posición en la molécula de triglicéridos. *Grasas y Aceites*. 36, 186-192.

- DOBARGANES, M.C.; RIOS, J.J.; PEREZ-CAMINO, M.C. (1986). Relaciones entre la composición de aceites vegetales y los componentes volátiles producidos durante su termoxidación. *Grasas y Aceites*, 37, 61-68.

- DOBARGANES, M.C. y PEREZ-CAMINO, M.C. (1988). Systemic evaluation of heated fat based on quantitative analytical methods. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 65, 101-105.

- DOBARGANES, M.C.; PEREZ-CAMINO, M.C.; MARQUEZ-RUIZ, G. (1988). High performance size exclusion chromatography of polar compounds in heated and non heated fats. *Fat. Sci. Technol.*, 90, 308-311.

- DOBARGANES, M.C.; PEREZ-CAMINO, M.C.; MARQUEZ-RUIZ, G. (1989). Determinación de compuestos polares en aceites y grasas de frituras. *Grasas y Aceites*, 40, 35-38.

- DOLPHIN, P.J. (1981). Serum and hepatic nascent lipoproteins in normal and hypercholesterolemic rats. *J. Lipid. Res.*, 22, 971-989.
- DURAND, G.; PASCAL, G.; LEGRAND, Ph. y GOUNELLE DE PONTANEL, H. (1985). Effets compares d'huiles vegetales et d'huiles de poisson sur la cholesterolemie des rat. Relations entre la composici3n en acides gras des lipides de la ration, celle de lipides seriques et la cholesterolemie. *Med. et Nut.*, XXI, 391-406.
- EDMOND, J. y POPJAK, G. (1974). Transfer of carbon atoms from mevalonate fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 249, 66.
- EHNHOLM, C.; HUTTUNEN, J.K.; PIETINEN, P.; LEINO; V. y MUTANEN, M. (1984). Effect of a diet low in saturated fatty acids on plasma lipids, lipoproteins and H.D.L. subfractions. *Arteriosclerosis*, 4, 265-269.
- EISENBERG, S. (1976). Lipoprotein metabolism and hyperlipemia. En: "Atherosclerosis Reviews" vol. 1 ed. Paoletti, R. and Gotto, A.M.; Raven Press, New York pp, 23-60.
- EISENBERG, S. y LEVY, R.I. (1976). Lipoprotein metabolism. *Adv. Lipid. Res.*, 13, 1-80.
- EKLUND, A. y SJOBL0M, L. (1980). Effects of the source of dietary protein on serum lower density lipoprotein (VLDL+LDL) and tocopherol levels in female rats. *J. Nutr.*, 110, 2321-2335.
- EKLUND, A. y SJOBL0M, L. (1986). Effect of dietary proteins on hepatic and plasma lipids, and some properties of mayor plasma lipoprotein fractions during dietary-induced hypercholesterolemia in male rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 887, 127-134.
- ELLIOT, W.H. y HYDE, P.M. (1971). Metabolic pathways of bile acid synthesis. *Am. J. Med.*, 51, 568.
- EL-SHATTORY, Y. y TAHA, F.S. (1980). Estudios sobre las caracteristicas f3sicas y qu3micas y la composici3n en 3cidos grasos del aceite de oliva. *Grasas y Aceites*, 31, (1), 23-26.
- EL-ZEANY, B.A. y ABDEL FATTAH, L.C. (1982). Reacci3n de oscurecimiento en l3pidos-proteinas oxidados. Parte 6. Oscurecimiento producido por las interacciones de 3cidos grasos libres con proteinas. *Grasas y Aceites*, 33, 216-219.

- EMERIT, I.; LEVY, A.; CERRUTTI, P. (1983). Suppression of tumor promoter for myristate acetate-induced chromosome breakage by antioxidants and inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Mutat. Res.*, 110, 327-335.
- ERICKSON, S. y COOPER, A.D. (1980). Acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase in human liver. In vitro detection and some characteristics of the enzyme. *Metabolism*, 29, 991.
- ERICKSON, S.K.; SHEWSBURY, M.A.; BROOKS, C. y col. (1980). Rat liver acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase. Its regulation in vivo and some of its properties in vitro. *J. Lipid. Res.*, 21, 930.
- FAERGEMAN, O.; SATA, T.; KANE, J.P. y HAVEL, R.J. (1975). Metabolism of apoprotein B of plasma very low density lipoproteins in the rat. *J. Clin. Invest.*, 56, 1396-1403.
- FARAG, R.S. y HALLABO, S. (1977). Comparison between the stability of sunflower, safflower and peanut oils towards oxidative rancidity by different methods. *Chem-Mikrobia. Technol. Lebensm.*, 5, 102-104.
- FARBER, E. (1967). Ethionine fatty liver. *Adv. Lipid. Res.*, 5, 119.
- FEDELI, E. (1988). The behaviour of olive oil during cooking and frying, En: "Frying of food. Principles, Changes, New Approaches". Ellis Horwood, Chichester, England, pp. 52-81.
- FERNANDEZ-SANCHEZ, A.J. (1991). Variaciones en la composición lipídica de microsomas de hígado de rata en respuesta a la ingesta de diferentes tipos de grasas. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
- FIELD, F.J.; ALBRIGHT, E.J. y MATHUR, S.N. (1987). Effect of dietary n-3 fatty acids on HMG-CoA reductase and ACAT activities in liver and intestine of the rabbit. *J. Lipid. Res.*, 28, 50-58.
- FIELDING, C.J. (1976). Lipoprotein lipase: evidence for high-and low-affinity enzyme sites. *Biochemistry*, 15, 879.
- FIELDING, P.E.; SHORE, V.G. y FIELDING, C.J. (1977). Lipoprotein lipase, isolation and characterization of a second enzyme species from postheparin plasma. *Biochemistry*, 16, 1896.

- FIELDING, C.J. y HAVEL, R.J. (1977). Lipoprotein lipase: properties of the enzyme in solution. Arch. Pathol. Lab. Med., 101, 225-229.
- FIGUEROA LALINDE, B. (1984). Grasas dietarias en frituras repetidas. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
- FIRESTONE, D. (1963). The determination of polymers in fats and oils. J. Am. Oil Chem. Soc., 40, 247-255.
- FIRESTONE, D.; STIER, R.F.; BLUMENTHAL, M.M. (1991). Regulation of frying fats and oils. Food Technol., 45, 90-94.
- FISCHER, L.R., MITCHELL, E.E. y PARKER, N.S. (1985). Interfacial tensions of commercial vegetable oils with water. J. Food. Sci., 50, 1201-1211.
- FLOREN, C.H. y NILSSON, A. (1977). Effects of fatty acid unsaturation on chylomicrom metabolism in normal and hepatectomized rats. Eur. J. Biochem., 77, 23-30.
- FOLCH, J.; LEES, M. y SLOANE-STANLEY, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of the total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 266, 497-509.
- FRANKEL, E.N. (1985). "Flavour Chemistry of fats and oils". Ed. Min, D.B. y Smouse, T.H., Am. Oil Chem. Soc., pp. 1,37.
- FRANKEL, E.N.; NEFF, W.E. y SELKE, E. (1981). Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry. VII. Volatile thermal decomposition products of pure hydroperoxides from autoxidized and photo sensitized oxidized methyl oleate, linoleate and linolenate. Lipids, 16, 279-285.
- FRANKEL, E.N. WARNER, K. y MOULTON, S.R. (1985). Effects of hydrogenation and additives on cooking-oil performance of soybean. J. Am. Oil Chem. Soc., 62, 1354-1358.
- FRERICHs, R.R.; SRINIVASAN, S.R., WEBBER, SL, y col (1976). Serum cholesterol and triglyceride levels in 3466 children from biracial Community, the Bogalusa Heart study. Circulation, 54, 302-318.
- FRITSCH, C.W. (1981). Measurements of frying fat deterioration. J. Am. Oil Chem. Soc., 6, 272-274.

- FRITSH, C.W., EGBERG, D.E y MAGNUSON, J.S. (1979). Changes in dielectric constant as a measure of frying oil deterioration. J. Am. Oil Chem. Soc., 56, 746-750.
- GARG, A.; BONANOME, A.; GRUNDY, S.M.; ZHANG, Z.J. y UNGER, R.H. (1988). Comparison of a high-carbohydrate diet with a high-monounsaturated fat diet in patients with non-insulindependent diabetes mellitus. N. Engl. J. Med., 319, 829-864.
- GARRIDO MOLINA, R. (1986). Algunos factores de riesgo de la enfermedad coronaria en una población de jóvenes aspirantes a la Academia General Militar. II. Factores protectores: HDL-colesterol, Apoproteínas A y AI. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
- GARRIDO POLONIO, M.C. (1991). Evaluación de la alteración de un aceite de girasol utilizado en frituras repetidas de patatas. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
- GASPAROLI, A.; FEDELI, E. y MASOTTI, M. (1991). Interazione lipide-alimento durante il processo di frittura. Riv. Ital. Sostanze Grasse, LXVIII, 243-250.
- GAVIGAN, S.J.P. y KNIGHT, B.L. (1981). Catabolism of low density lipoprotein by fibroblasts cultured in medium supplemented with saturated or unsaturated free fatty acids. Biochem. Biophys. Acta, 665, 632-635.
- GERE, A. (1982). Studies of the changes in edible fats during heating and frying. Nahrung, 26, 923-932.
- GERE, A. (1983a). Einfluss einiger faktoren auf den verderb von fritierfetten. Fette Seifen Anstrichmittel, 85, 18-23.
- GERE, A. (1983b). Ein komplexes verfahren zur analyse von gebrauchten fritierfetten. Fette Seifen Anstrichmittel, 85, 111-117.
- GERE, A. (1984). Degradation thermique de quelques corps gras hongrois. Rev. franc. Corps Gras., 31, 437-442.
- GERE, A., GERTZ, Ch. y MORIN, O. (1984). Methodological studies on the quantitation of cyclic monomers formed in fats, during heating, Rev. franc. Corps Gras., 31, 341-346.

- GHAVANI, M. y MORTON, J.D. (1984). Effect of heating at deep-fat frying temperatures on the sterol content of soya bean-oil, J. Sci. Food Agric., 35, 569-572.
- GIANI, E; MASI, J. y GALLI, C. (1985). Heated fats, vitamin E and vascular eicosanoid. Lipids, 20, 439-448.
- GIANTURCO, S.M.; GOTTO, A.M. Jr, HWANG, S.L.C.; KARLIN, J.B.; LIN, A.H.Y.; PRASAD, S.C. y BRADLEY, W.A. (1983). Apolipoprotein E mediates uptake of sf 100-400 hypertriglyceridemic very low density lipoproteins by the low density lipoprotein receptor pathway in normal human fibroblasts. J. Biol. Chem. 258, 4526-4533.
- GLASS, C.; PITTMAN, R.C.; WEINSTEIN, D.B. y STEINBERG, D. (1983). Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that to apoprotein A-I of rat plasma high density lipoproteins: selective delivery of cholesterol esters to liver, adrenal and gonad. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80, 5435-5439.
- GLOMSET, J.A. y NORUM, K.R. (1973). The metabolic role of lecithincholesterol acyltransferase. Perspectives from pathology. Adv. Lipid Res., 11, 1-65.
- GOH, E.H. y HEIMBERG, M. (1977). Effects of free fatty acids on activity of hepatic microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and on secretion of triglyceride and cholesterol by liver. J. Biol. Chem., 252, 2822.
- GOMES, T. (1983). Determinazione di oligopolimeri e prodotti di ossidazione in oli vegetali termoossidati. Riv. Ital. Sostanze Grasse, 60, 77-80.
- GOMEZ, A. (1988). Metabolismo de las lipoproteinas. En: "Lipoproteinas plasmáticas". Boehringer Mannheim, S.A. Barcelona. 47-58.
- GOMEZ-ELVIRA, M.C. (1987). Las grasas calentadas. Revista de información al consumidor. Febrero/Marzo.
- GONZALEZ, G.; FERNANDEZ-SIMON, L.; CASCALES, M. y RODRIGUEZ-FARRE, E. (1982). Biopatología experimental de las lesiones inducidas por la acción de aceites asociados al síndrome tóxico. Programa del CSIC para el estudio del síndrome tóxico, 2, 333-340.
- GOODMAN, D.S.; DEYKIN, D. y SHIRATORI, T. (1964). The formation of cholesterol esters with rat liver enzymes. J. Biol. Chem., 239, 1335.

- GORDON, M.H. y MAGOS, P. (1984). The effect of sterols on the oxidation of edible oils. Food Chem., 10, 141-147.
- GOULD, R.G.; BELL, V.L. y LILLY, E.H. (1959). Stimulation of cholesterol biosynthesis from acetate in rat liver and adrenals by whole body X-irradiation. Am. J. Physiol., 196, 1231.
- GRANDE, F. (1989). "Introducción". En: "Dietary fats and cardiovascular disease. A colloquium". Commission of the European Communities. Sevilla. 30 de mayo. pp. 1.
- GRANDGIRARD, A. y JULLIARD, F. (1983). Determination of cyclic monomers in heated oils. A critical study. Rev. franc. Corps Gras., 30, 123-128.
- GRANDGIRARD, A., SEBEDIO, J.L., FLEURY, J. (1984). Geometrical isomerization of linolenic acid during heat treatment of vegetable oils. J. Am. Oil Chem. Soc. 61, 1563-1568.
- GREEN, P.H.R.; GLICKMAN, R.M.; SAUDEK, C.D.; BLUM, C.B. y TALL, A.P. (1979). Human intestinal lipoprotein-studies in chyluric subjects. J. Clin. Invest., 64, 233.
- GREEN, M.H. y GREEN, J.B. (1983). Effects of dietary fat saturation and triglyceride and cholesterol load on lipid absorption in the rat. Atherosclerosis, 46, 181-194.
- GREEN, M.H.; MASSARO, E.R. y GREEN J.B. (1984). Multicompartmental analysis of the effects of dietary fat saturation and cholesterol on absorptive lipoprotein metabolism in the rat. Am. J. Clin. Nutr., 40, 82-94.
- GRUNDY, S.M. (1986). Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol. N. Engl. J. Med., 314, 745-748.
- GRUNDY, S.M. (1987). Monounsaturated fatty acids, plasma cholesterol and coronary heart disease. Am. J. Clin. Nutr., 45, 1168-1175.
- GRUNDY, S.M. y DENKE, M.A. (1990). Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. J. Lipid. Res., 31, 1149-1172.

- GRUNDY, S.M.; FLORENTIN, L.; NIX, D. y WHELAN, M.F. (1988). Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for reducing raises levels of plasma cholesterol in man. *Ann. J. Clin. Nutr.*, 47, 965-969.
- GRUNDY, S.M. y VEGA, G.L. (1988). Plasma cholesterol responsiveness to saturated fatty acids. *Ann. J. Clin. Nutr.*, 47, 822-824.
- GUILLAUMIN, R. (1973). Determination des espèces chimiques nouvelles formées durant le chauffage des huiles. *Rev. franc. Corps Gras.*, 20, 285-289.
- GUILLAUMIN, R. (1979). Chemical control and regulatory aspects in France. New results for the food physiology of heated fats. *Fette Seifen Anstrichmittell*, 81, 545-552.
- GUILLAUMIN, R. (1980). Huiles chauffées. Aspects analytiques. *Ann. Nutr. Alim*, 34, 365-376.
- GUILLAUMIN, R. (1988). Kinetics of fat penetration in food, En: "Frying of Food. Principles, Changes, New Approaches". eds. G. Varela, A.E. Bender y I.D. Morton. Ellis Horwood, Chichester, England, pp. 82-90.
- GUILLAUMIN, R., GENTE, M. y DESRIEUX, M. (1973). Etude de l'influence des operations de friture sur le pourcentage d'espèces chimique nouvelles (E.Q.N). Examen de diverses huiles, *Rev. franc Corps gGas.*, 20, 413-419.
- GUILLAUMIN, R., COQUET, B., and ROUAND, J.D. (1978). Etude physiopathologiques sur rats de quelques huiles alimentaires chauffées. *Ann. Nutr. Alim.*, 32, 467-481.
- GUO, L.S.; HAMILTON, R.L.; OSTWALD, R. y HAVEL, R.J. (1982). Secretion of nascent lipoproteins and apolipoproteins by livers of normal and cholesterol-fed guinea pigs. *J. Lipid. Res.*, 23, 543-555.
- GUTIERREZ GONZALEZ-QUIJANO, R. y DOBARGANES, M.C. (1988). Analytical procedures for the evaluation of used frying fats. En: "Frying of Food". Principles, Changes, New Approaches". Ellis Horwood, Chichester, England, pp. 141-154.
- HA, Y.C.; CALVERT, G.D.; McINTOSH, C.H. y BARTER, P.J. (1981). A physiologic role for the esterified cholesterol transfer protein: in vivo studies in rabbits and pigs. *Metabolism*. 30, 380.

- HA, Y.C; CHANG, L.B.T.; BARTER, P.J. (1985). Effects of infecting exogenous lipid transfer protein into rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 823, 203-210.
- HAMPRECHT, B.; ROSCHER, R.; WALTINGER, G. y COL. (1971). Influence of bile acids on the activity of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. 2. Effect of cholic acid in lymph fistula rats. *Eur. J. Biochem.*, 18, 15.
- HARRIS, W.S.; CONNOR, W.E. y McMURRY, M.P. (1983). The comparative reduction of the plasma lipids and lipoproteins by dietary polyunsaturated fats: salmon oil versus vegetable oils. *Metabolism*, 32, 179-184.
- HARWOOD, H.J. y GEYER, R.P. (1975). Properties and fatty acid composition of fats and oils. En: *Lipids, Carbohydrates, Steroids*. 3rd ed. Fasmas G.D. (ed.). CRC PRESS. Cleveland (Ohio).
- HAVEL, R.J.; KANE, J.P y KASHYAP, M.L. (1973). Interchange of apolipoproteins between chylomicrons and high density lipoproteins during alimentary lipemia in man. *J. Clin. Invest.*, 52, 32-38.
- HERMUS, R. (1975). Experimental atherosclerosis in rabbits on diets with milk fat and different proteins. Tesis Doctoral. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen. Holanda.
- HERNANDEZ, I. (1989). Tecnología de la fritura: evaluación de la termoxidación de un aceite de oliva empleado en frituras de patatas. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
- HERNANDEZ, I., SANCHEZ-MUNIZ, F.J. y CUESTA, C. (1989). Evaluación de la termoxidación de un aceite de oliva empleado en frituras de patatas. Correlación entre las fracciones no alteradas de Triglicéridos y ésteres metílicos. *Grasas y Aceites*, 40, 257-263.
- HIGGINS, J.A. y FIELDSEND, J.K. (1987). Phosphatidylcholine synthesis for incorporation into membrane or for secretion as plasma lipoproteins by Golgi membranes of rat liver. *J. Lipid. Res.*, 28, 268-278.
- HIGON, E. (1985). Consumo de aceites y oleanilidas. Influencia sobre la composición del tejido adiposo de rata. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.

- HO, S.H. y MONACO, P.A. (1985). Effect of dietary cholesterol and degree of fat insaturation on plasma lipids levels, lipoprotein composition, and fecal steroid excretion in normal young adult men. *Am. J. Clin. Nutr.*, 42, 399-413.
- HOSTMARK, A.T.; SPYDEVOLD, O.L y EILERTSEN, E. (1980). Plasma lipid concentration and liver output of lipoproteins in rats fed coconut fat or sunflower oil. *Artery*, 367-383.
- HOSTMARK, A.T.; SPYDEVOLD, O. y LYSTAD, E. (1982). Plasma high density lipoprotein subgroup distribution in rats fed diets with varying amounts of sucrose and sunflower oil. *Lipids*, 17, 489-499.
- HUANG, A.S.; HSIEH, A.L.; HUANG, C.L.Y.; CHANG, S.S. (1981). A comparison of the stability of sunflower oil and corn oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 58, 997-1001.
- HUANG, Y.S.; NASSAR, B.A. y HORROBIN, D.F. (1986). Change of plasma lipids and long-chain n-3 and n-6 fatty acids in plasma, liver, heart and kidney phospholipids of rats fed variable levels of fish oil with or without cholesterol supplementation. *Biochim. Biophys. Acta*, 879, 22-27.
- HUI, D.Y.; INNERARITY, T.L. y MAHLEY, R.W. (1981). Lipoprotein binding to canine hepatic membranes. Metabolically distinct apo-E and apo-B, E receptors. *J. Biol. Chem.*, 256, 5646-5655.
- HWANG, D.H.; BOUDREAU, M. y CHANMUGAM, P. (1988). Dietary linolenic acid and longer-chain n-3 fatty acid: comparison of effects on arachidonic acid metabolism in rats. *J. Nutr.*, 118, 427-437.
- ILLINGWORTH, D.R.; HARRIS, W.S. y CONNOR, W.E. (1984). Inhibition of low density lipoprotein synthesis by dietary omega-3 fatty acids in humans. *Arteriosclerosis*, 4, 270-275.
- IMAIZUMI, K.; MAWATARI, K.; MURATA, M.; IKEDA, I. y SUGANO, M. (1983). The contrasting effects of dietary phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine on serum lipoproteins and liver lipids in rat. *J. Nutr.*, 113, 2403-2411.
- INOVE, H.; KONISHI, K. y TANIGUCHI, N. (1970). Analysis of thermal polymeric fatty acids, methyl esters and alcohols on Sephadex LH-20, *J. Chromatogr.*, 47, 348-354.

- IRITANI, N. y FUJIKAWA, S. (1982). Competitive incorporation of dietary w-3 and w-6 polyunsaturated fatty acids into the tissue phospholipids in rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 29, 11-21.
- IRITANI, N. y NORITA, R. (1984). Changes of arachidonic acid and n-3 polyunsaturated fatty acids of phospholipid classes in liver, plasma, and platelets during dietary fat manipulation. Biochem. Biophys. Acta., 793, 441-447.
- IZAKI, Y.; YOSHIKAWA, S. y VCHIYAMA, M. (1984). Effect of ingestion of thermally oxidized frying oil on peroxidative criteria in rats. Lipids, 19, 324-331.
- JACOBSON, G.A. (1967). Quality control of comercial deep fat frying. Food technol., 21, 43-47.
- JACOBSON, G.A. (1991). Quality control in deep-fat frying operations. Food Technol., 45, 77-80.
- JACOBSON, G.A.; HORSELY, D.M. y FORD, J.A. (1989). Correlation of instrumental and sensory analyses of lipid foods. En: "Flavour chemistry of Lipid Foods", ed. D.B. Min y T.H. Smouse. 421, Am. oil. Chem. Soc., pp. 421-440.
- JANERO, D.R.; SUITA--MANGANO, P.; MILLER, K.W. y LANE, M.D. (1984). Synthesis, processing and secretion of hepatic very low density lipoproteins. J. Cell. Biochem., 24, 131-151.
- JOHNSON, M.R.; MATHUR, S.N.; COFFMAN, C. y SPECTOR, A.A. (1983). Dietary fat saturation and hepatic acylcoenzyme A: cholesterolacyltransferase activity. Effect on n-3 polyunsaturated and long-chain saturated fat. Arteriosclerosis, 3, 242-248.
- KAAANANE, A. y LABUZA, T.P (1989). The Maillard reaction in foods. En: "The Maillard reaction in Aging, Diabetes, and Nutrition", ed. I.W. Baynes and V.M. Monnier, John Wiley and sons, New York, pp. 301-315.
- KANAZAWA, K.; KANAZAWA, E. y NATAKE, M. (1985). Uptake of secondary autoxidation products of linoleic acid by the rats. Lipids, 20, 412-418.
- KANE, J.P.; HARDMAN, D.A. y PAULUS, H.E. (1980). Heterogeneity of apolipoproteins B; isolation of a new species from human chylomicrons. Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 77, 2465-2469.

- KANNEL, W.B.; CASTELLI, W.P.; GORDON, T. y McNAMARA, P.M. (1971). Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham Study. *Ann. Inter. Med.*, 74, 1-12.
- KASHYAP, M.L.; BARNHART, R.L.; SRWASTAVA, L.S.; PERISUTTI, G.; ALLEN, C.; HOGG, E.; GLUECK, C.J. y JACKSON, R.L. (1983). Alimentary lipemia, plasma high-density lipoproteins and apolipoproteins C-II and C-III in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 37, 233-243.
- KAUNITZ, H. (1967). Nutritional aspects of thermally oxidized fats and oils. *Food Technol.*, 21, 278-282.
- KAUNITZ, H.; JOHNSON, R.E. y PEGUS, L. (1966). Longer survival time of rats fed oxidized vegetable oils. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 123, 204.
- KEANE, K.W.; JACOBSON, G.A. y KRINGER, C.H. (1959). Biological and chemical studies on commercial frying oils. *J. Nutr.*, 68, 57-74.
- KEHRER, J.P. y WITSCHI, H. (1980). Effects of drug metabolism inhibitors on butylated hydroxytolvene-induced pulmonary toxicity in mice. *Toxic. appl. Pharmac.*, 53, 333-340.
- KEKKI, M. (1980). Lipoprotein lipase action determining plasma high density lipoprotein cholesterol in adult normolipemics. *Atherosclerosis*, 37, 3-50.
- KELLER, C. y ESCHER, F. (1989). Heat and mass transfer during deep fat frying of potato products. *International Congress of Engineering and food.*, Cologne, Germany.
- KEYS, A.; ANDERSON, J.T. y GRANDE, F. (1957). Prediction of serum cholesterol responses of man to changes in fats in the diet. *Lancet.*, 2, 959-966.
- KHUN THI-DINH, K.L.; DEMARNE, Y.; NICOLAS, C. y LHUILLERY, C. (1990). Effect of dietary fat on phospholipid class distribution and fatty acid composition in rat fat cell plasma membrane. *Lipids*, 25, 278-283.
- KINSELLA, J.E. (1987). The effects of dietary n-3 PUFAS of fish oil on serum lipids, eicosanoids and trombotic events: observations from animal feeding trials. En: "Seafoods and fish oils in human health and disease". Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 107-164.

- KINSELLA, J.E.; LOKESH, B; CROSET, M.; BLACK, M. y SURELTE, M. (1990a). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids: effects on membrane enzyme activities and macrophage eicosanoid synthesis. En: "Health effects of fish and fish oils", ed. R. Chandra. St John' New Foudland Press. St John.
- KINSELLA, J.E.; LOKESH, B y STONE, R.A. (1990b). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. Am. J. Clin. Nutr., 52, 1-28.
- KISSEBAH, A.H.; ALFARSI, S. y EVANS, D.J. (1984). Low density lipoprotein metabolism of apolipoprotein B in familiar combined hyperlipidemia. Arteriosclerosis., 4, 614-624.
- KRAUS, R.M.; HERBERT, P.N.; LEVY, R.I. y FREDICKSON, D.S. (1973). Futher observations of the activation and inhibition of lipoprotein lipase by apolipoproteins. Circ. Res., 33, 403-411.
- KRIS-ETHERTON, P.M.; HO, C.Y. y FOSMIRE, M.A. (1984). The effect of dietary fat saturation on plasma and hepatic lipoproteins in the rat. J. Nutr., 114, 1675-1682.
- KRITCHEVSKY, D. (1979). Vegetable protein and atherosclerosis. J. Amer. Oil. Chem. Soc., 56, 135-141.
- KRITCHEVSKY, D. y TEPPER, S.A. (1967). Cholesterol vehicle in experimental atherosclerosis. J. Atheroscle. Res., 7, 647-651.
- KUPRANCYCZ, D.B.; AMER, M.A. y BAKER, B.E. (1986). Effects of thermal oxidation on the constitution of butter fat fractions and certain vegetable oils. J. Amer. oil. chem. Soc., 63, 332-337.
- KURECHI, T. y KATO T. (1982). Studies on the antioxidants XV. Combination effects of butylated hydroxianisole butylated hydroxytoluene and their analogs on hydrogen donation to 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. Chem. Pharm. Bull., Tokyo, 29, 3012-3016.
- KYOKO-HARA S.C. y DENSHIRO F.J. (1989). Measurement of polymer and polar material content for assessment of the deterioration of soybean oil due to heat cooking. J. Jpn. Oil. Chem. Soc., 38, 463-469.
- LACKO, A.G.; RUTEMBERG, A.L. y SOLOFF, L.A. (1974). Atherosclerosis, 19, 297-304.

- LAKSHMAN, M.R.; CHIRTEL, S.J. y CHAMBERS, L.L. (1988). Roles of w-3 fatty acids and chronic ethanol in the regulation of plasma and liver lipids and plasma apoproteins A and E in rats. *J. Nutr.*, 118, 1299-1303.
- LANDS, W.E.M. (1986). Fish and human health. Academic Press, Inc. Orlando.
- LANG, K. (1973). Die Physiologischen wirkungen erhitzter Fette, insbesondere der Frittierfette. *Fette, Seifen Anstrichmittel*, 75, 73-76.
- LANTEAUME, M.T.; RAMEL, P.; Le CLERC, A.M. y RANNAUD, J. (1966). Influence de la friture et du chauffage sur les effets physiologiques d'une huile tres riche en acide linoléique, Huile de pepins de raisin. *Rev. Franc Corps Gras.*, 13, 603-613.
- LANTEAUME, M.T.; RAMEL, P.; ACKER, P.; LE CLERC, A.M. y WIRTH, C. (1968). Physiological effects on the dog of a heat degraded very unsaturated oil. *Rev. Franc. Corp. Gras.*, 15, 71-79.
- LAROSA, J.C.; LEVY, J.I.; HERBERT, P.N.; LUX, S.E. y FREDRICKSON, D.S. (1970). A specific apoprotein activates for lipoprotein lipase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 41, 57-62.
- LE FLOCH, E.; ACKER, P.; RAMEL, P.; LANTEAUME, M.T. y LE CLERC, A.M. (1968). Les effets d'un chauffage de type culinaire sur les principaux corps gras alimentaires, ses incidences physiologiques et nutritionnelles. *Ann. Nutr. Alim.*, 22, 249-265.
- LHUUSIER, M. y POTTEAU, B. (1978). Valeur nutritionnelle et effets physiologiques des corps gras chauffés. *Rev. Franc. Corps Gras.*, 10, 10, 561-604.
- LEILA, G.S. y BETH, F. (1988). Effect of dietary fat and carbohydrate on weight gain and serum lipids in rats. *Nutr. Reports. Int.*, 37, 1321-1326.
- LEONARD, E.C. (1975). The Dimer Acids. Ed. Humko Sheffield Chemical, Connecticut.
- LOCK, D.R.; VARHOL, A.; GRIMES, S.; PATSCH, W. y SCHONFELD, G. (1983). Apo A-I/Apo A-II ratios in plasma of vegetarians. *Metabolism.*, 32, 1142-1145.
- LOMANNO, S.S. y NAWAR, W.W. (1982). Effect of heating temperature and time on the volatile oxidative decomposition of linoleate. *J. Food Science*, 47, 744-746.

- LOSCALZO, J.; FREDMAN, J.; RUDD, R.M.; BARSKYVASSERMAN, I. y VAUGHAN, D.E. (1987). Unsaturated fatty acids enhance low density lipoprotein uptake and degradation by peripheral blood mononuclear cells. *Arteriosclerosis*, 7, 450-455.
- LUMLEY, I.D. (1988). Polar compounds in heated oils. En: "Frying of Food. Principles, Changes, New Approaches". eds. Varela, G., Bender, A.I. y Morton, I.D. Ellis Horwood, Chichester, England, pp. 167-173.
- MC CARD, J.M; PETRONE, W.F. (1982). A superoxide activated lipid-albumin chemotactic factor for neutrophils. En: "lipid Peroxides in Biology and Medicine", ed. K. Yagi. New York. pp. 123-129.
- MAHLEY, R.W.; WEISGRABER, K.M. y INNERARITY, T. (1974). Canine lipoproteins and atherosclerosis II. Characterization of the plasma lipoproteins associated with atherogenic and nonatherogenic hyperlipemia. *Circ. Res.*, 35, 722-728.
- MAHLEY, R.W.; y HOLCOMBE, K.S. (1977). Alterations of the plasma lipoproteins and apoproteins following cholesterol feeding in the rat. *J. Lipid. Res.*, 18, 314-324.
- MAI, J.; SHIMP, J.; WEIHRAUCH, J. y KINSELLA, J. (1978). Lipids of fish fillets: changes following cooking by diferents methods. *J. Food Science*, 43, 1669-1673.
- MARINO, A.A. y MITCHELL, J.T. (1972). Lung damage in mice following intraperitoneal injection of butylated hydroxytoluene. *Proc. Soc. Exp. biol. Med.*, 140, 122-128.
- MARQUEZ-RUIZ, G.; PEREZ-CAMINO, M.C. Y DOBARGANES, M.C. (1990a). Evaluación nutricional de grasas termoxidadas y de fritura. *Grasas y Aceites*, 41, 432-439.
- MARQUEZ-RUIZ, G.; PEREZ CAMINO, M.C. Y DOBARGANES, M.C. (1990b). Combination of adsorption and size-exclusion chromatography for the determination of fatty acid monomers, dimers and polymers. *J. Chromatogr.*, 514, 37-44.
- MARSHALL, P.J; LANDS, W.E.M. (1984). Generation of hydroperoxide activators for prostaglandin H synthase by granulocytes. *Fed. Proc.*, 43, 846 (Abs).

- MASSARO, E.R.; GREEN, J.B. y GREEN, M.H. (1981). Effect of dietary p/s ratio on chylomicron composition and turnover in rats. Fed. Proc., 40, 663. (abs).
- MATTSON, F.H. y GRUNDY, S.M. (1985). Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. J. Lipid. Res., 26, 194-202.
- MEDINA SAN NICOLAS, R. (1986). Cambios y posibles interacciones entre las grasas de fritura y del interior del alimento, durante el proceso de frituras repetidas de un pescado azul. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
- MELTZER, J.B.; FRANKEL, E.N.; BESSLER, T.R. y PERKINS, E.G. (1981). Analysis of thermally abused soybean oils for cyclic monomers. J. Am. Oil Chem. Soc., 58, 779-784.
- MENSINK, R.P. y KATAN, M.B. (1987). Effect of monounsaturated fatty acids versus complex carbohydrates on high-density lipoproteins in healthy men and women. Lancet, 1, 122-125.
- MENSINK, R.P.; DE GROOT, M.J.M.; VAN DEN BROEKE, L.T.; SERVRIJNEN-NOBELS, J.P.; DEMACKER, P.N.M. y KATAN, M.B. (1989). Effects of monounsaturated fatty acids versus complex carbohydrates on serum lipoproteins and apoproteins in healthy men and women. Metabolism, 38, 172-178.
- METCALFE, L.V.; SCHMITZ, A.A. y PELKA, J.R. (1966). Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. Anal. Chem., 38, 514-515.
- MEYER, H. (1979). Eine neue und einfache Schenllmethade zur Erfassung der oxidativen Zersetzungsgrades thermisch belasteter Fette. Fette Seifen Anstrichmittel, 81, 524-533.
- MILLER, G.E. y MILLER, N.E. (1975). Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease. Lancet, 1, 16-19.
- MILLER, C.A. y NEOGI, P. (1985). Interfaces in motion-stability and wave motion. Interfacial phenomena. En: " Equilibrium and dynamic effects, surfactant science series". Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 184-204.

- MILLER, L.A. y WHITE, P.J. (1988). High-temperature stabilities of low-linolenate, high-stearate and common soybean oils. J. Am. Oil. Chem. Soc., 65, 1324-1329.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION. (1986). Normas Técnicas de análisis de aceites comestibles. En: "Manual de legislación para la inspección de calidad de alimentos. XVI. Grasas comestibles". Dirección General de Política Alimentaria. Centro de Publicaciones. Madrid. pp 15-17.
- MINISTERIO DE RELACIONES CON LAS CORTES Y DE SECRETARIA DEL GOBIERNO. Orden 26 de Enero de 1.989. (B.O.E., número 26 del 3 de Enero de 1.989). Aceites y Grasas. Normas de calidad para los calentados.
- MIYASHITA, K.; FUJIMOTO, K.; KANEDA, T. (1982). Structures of dimers produced from methyl linoleate during initial stage of autoxidation. Agric. Biol. Chem., 46, 2293-2297.
- MIZUTANI, T.; NOMURA, H.; YAMAMOTO, K. y TAJIMAK, K. (1984). Modification of butylated hydroxy toluene-induced pulmonary toxicity in mice by diethyl maleate buthionine sulfoximine, and cysteine. Toxicology Lett., 23, 327-333.
- MOREIRAS-VARELA, O.; RUIZ-ROSO, B. y VARELA,, G. (1988). Effects of frying on the nutritive value of food. En "Frying of food. Principles, Changes, New approaches". eds. Varela, G., Bender, A.I. y Morton, I.D. Ellis Horwood, Chichester, England, pp. 93-102.
- MORRISON, W.H. y ROBERTSON, J.A. (1978). Hydrogenated sunflowerseed oil: oxidative stability and polymer formation on heating. J. Am. Oil Chem. Soc., 55, 451-453.
- MORTON, I.D. (1977). Physical, chemical and biological changes related to different time temperature combinations. En: "Physical, Chemical and Biological Changes in Food Caused by Thermal Processing". Applied Science Publishers, London, pp 135.
- MORTON J.D. y ALIM, H. (1974). Oxidation in foodstuffs fried in edible oils. Proceedings of the IV Congress Food Science and Technology, Madrid Vol I, 345.
- MORTON, J.D. y CHIDLEY, J.E. (1988). Methods and equipment in frying. En: "Frying of Food, Principles, Changes, New Approaches". eds. G. Varela, A.E. Bender y I.D. Morton. Ellis Horwood, Chichester England, pp. 37-51.

- MOSBACH, E.H. (1972). Hepatic synthesis of bile acids. Arch. Intern. Med., 130, 478-482.
- MUKAI, F.H.; GOLDSTEIN, B. (1976). Mutagenicity of Malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. Science, 191, 868-869.
- MYANT, N.B. y MITROPOULOS, K.A. (1977). Cholesterol 7-alfa-hidroxylase. J. Lipid. Res., 18, 135-142.
- NAIM, M.; MORLEY, R.; KARE, H. y INGLE, E.D. (1977). Sensory factors which affect the acceptance of raw and heated deffated soybeans by rat. J. Nutr., 109, 1653-1658.
- NAKAGAWA, Y.; TAYAMA, K.; NAKAO, T., y HIRAGA, K. (1984). On the mechanism of butylated hydroxytoluene-induced hepatic toxicity in rats. Biochem. Pharmac., 33, 2669-2680.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978). Nutrient requeriments of Laboratory rats. En "Nutrient requeriments of laboratory animals. 3er. revised ed., pp. 7-37. National Academy of Sciences, Washington DC.
- NAVARRO, M.P.; CASTRILLON, A.M.; CONDE, R. y VARELA, G. (1982). Repercusiones nutritivas sobre la utilización nutritiva de macronutrientes. Programa del CSIC para el estudio del síndrome tóxico., 2, 290-296.
- NAWAR, W.W. (1984). Chemical changes in lipids produced by thermal processing. Journal Chem. Educ., 61, 299-302.
- NAWAR, W.W. (1985a). Chemical changes in food during Processing, ed. T. Richardson y J.W. Finley. Avi, Westport, Connecticut. pp. 79-103.
- NAWAR, W.W. (1985b). Flavour Chemistry of fats and oils, ed. D.B. Min y T.H. Smouse. Am. Oil Chem. Soc. pp. 39-60.
- NAWAR, W.W.; BRADLEY, S.J.; LAMANNO, S.S.; RICHARDSON, G.G. y WITEMAN. (1978). Lipids as a source of flavor, ed. Am. Chem. Soc. pp. 42-55.
- NERVI, F.O. y DIETSCHY, J.M. (1978). The mechanims of and the interrelationship between bile acid and chylomicron-mediated regulation of hepatic cholesterol synthesis in the liver of the rat. J. Clin. Invest., 61, 895-890.

- NESTEL, P.J. (1987). Polyunsaturated fatty acids (n-3, n-6). *Am. J. Clin. Nutr.*, 45, 1161-1167.
- NESTEL, P.J. (1990). Effects of n-3 fatty acids on lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, 10, 149-167.
- NESTEL, P.J. (1991). Review: fish oil and cardiac function. *World Rev. Nutr. Diet.*, 66, 268-277.
- NESTEL, P.J.; REARDON, M y BILLIGTON, T. (1979). In vivo transfer of cholesteryl ester from high density lipoproteins to very low density lipoproteins in man. *Biochem. Biophys. Acta*, 573, 403-410.
- NESTEL, P.J.; CONNOR, W.E.; REARDON, M.F.; CONNOR, S.; WONG, S. y BOSTON, R. (1984). Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man. *J. Clin. Invest.*, 74, 82-89.
- NICHOLS, A.V; GONG, E.L. y BLANCHE, P.L. (1981). Interconversion of high density lipoproteins during incubation of human plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 100, 391-393.
- NICOLASI, R.J. y HAYES, K.C. (1980). Composition of plasma and nascent very low density lipoprotein from perfused livers of hypercholesterolemic squirrel monkeys. *Lipids*, 15, 549-554.
- NICOLASI, R.J.; STTUCHI, A.F.; KOWALA, M.C.; HENNESSY, L.K.; HEGSTED, D.M. y SHAEFER, E.J. (1990). Effect of dietary fat saturation and cholesterol on LDL composition and metabolism. *Arteriosclerosis*, 10, 119-129.
- NIELSEN, H.K.; LOLIGER, J. y HURRELL, R.F. (1985). Reactions of proteins with oxidizing lipids, 1. Analytical measurements of lipid oxidation and of aminoacid losses in a whey protein-methyl linolenate model system. *Brit. J. Nutr.*, 53, 61-73.
- NIKKILA, E.A.; KUUSI, T. y TASKINEN, M.R. (1978a). Role of lipoprotein lipase in the metabolism of high density lipoproteins: a novel concept on cholesterol transport in HDL cycle. En: "Metabolic risk factors in cardiovascular disease", ed. L.A. Carlsson y B. Pernow,. Reaven Press. New York. pp 205-215.
- NIKKILA, E.A., TASKINEN, M.R., KEKKI, M. (1978b). Relation of plasma high-density lipoprotein cholesterol to lipoprotein-lipase activity in adipose tissue and skeletal muscle of men. *Atherosclerosis*, 29, 197-202.

- NISHIGAKI, J.; HAGIHARA, M.; MASEKI, M.; TOMODA, Y.; NAGAYAMA, K.; NAKASHIMA, T. y YAGI, K. (1984). Effect of linoleic acid hydroperoxide on uptake of low density lipoprotein by cultured smooth muscle cells from rabbit aorta. *Biochem. Int.*, 8, 501-510.
- NOLEN, G.A. (1972). Effects of fresh and used hydrogenated soybean oil on reproduction and teratology in rats. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 49, 688-693.
- NOLEN, G.A. (1973). A feeding study of used partially hydrogenated soybean oil, frying fat in dogs. *J. Nutr.*, 103, 1248-1252.
- NOLEN, G.A.; ALEXANDER, J.C. y ARTMAN, N.R. (1967). Long-term rat feeding study with used frying fats, *J. Nutr.*, 93, 337-348.
- NORMA UNE - 55-011 (1964). "Determinación de la acidez libre". Instituto Nacional de Racionalización y Normalización (IRANOR). Madrid.
- NORMA UNE - 55-015 (1958). "Índice de Refracción". Instituto Nacional de Racionalización y Normalización (IRANOR). Madrid.
- NORMA UNE - 55-047-73 (1973). "Medida espectrofotométrica de la absorción en la región ultravioleta ". Instituto Nacional de Racionalización y Normalización (IRANOR). Madrid.
- NORMA UNE - 55-095 (1973). "Aceite de Girasol refinado para consumo alimenticio". Instituto Nacional de Racionalización y Normalización (IRANOR). Madrid.
- NORUM, K.R.; BERG, T.; HELGERUD, P. y DREVON, C.A. (1983). Transport of cholesterol. *Physiol. Rev.*, 63, 1343-1419.
- OHLSON, R. (1983). Structure and physical properties of fats. En: "Dietary fats and health", ed. E.G. Perkins y W.J. Visek. *Am. Oil. Chem. Soc.*, pp. 44-55.
- ORAM, J.F.; ALBERTS, J.J.; CHEUNG, M.C. y BIERMAN, E.L. (1981). The effects of subfractions of high density lipoproteins on cholesterol efflux from cultured fibroblasts. Regulation of low density lipoprotein receptor activity. *J. Biol. Chem.*, 256, 8348.

- OTTER, A.M. (1970). The dimerization of oleic acid with a Montmorillonite catalyst I. Important process parameters; some main reactions. *Fette Seifen Anstrichmittes*, 72, 667-673.
- OYA, M.; MATA, P.; ALVAREZ-SALA, D.A. y RUBIO, M.J. (1989). Efecto sobre las lipoproteínas plasmáticas de dietas ricas en aceite de oliva o ricas en aceite de girasol. En "Dietary fats and cardiovascular disease. A colloquium". Commission of the European Communities. Sevilla. 30 de Mayo. pp. 6-8.
- PACCALIN, J. y JULLIET, M.T. (1982). Quelle Huile de Friture?. *Medecine Generale*, 109-114.
- PARADIS, A.J. y NAWAR, W.W. (1981a). Evaluation of new methods for the assessment of used frying oils. *J. Food Sci.*, 46, 449-451.
- PARADIS, A.J. y NAWAR, W.W. (1981b). A gas chromatography method for the assesment of used frying oil. Comparison with other methods. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 58, 635-639.
- PARDUM, H.; BLASS, J. y KROLL, E. (1974). Veranderungen der Fette unter Fritierbedingungen und deren analytische Erfassung Beurteilung des Gebrauchswertes und Analytik von Fritierfetten. *Fette Seifen Anstrichmittes*, 75, 97-104.
- PARKS, J.S. y BULLOCK, B.C. (1987). Effect of fish oil versus lard diets on the chemical and physical properties of low density lipoproteins of nonhuman primates. *J. Lipid. Res.*, 28, 173-182.
- PARTHASARATHY, S.; WIELAND, E. y STEINBERG, D. (1989). A role for endothelial cell lipoxxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1046-1050.
- PATHS, R.J.; GOTTO, A.M. Jr; OLIVECRONA, T. y EISENBERG, S. (1978). Formation of high density lipoprotein 2 like particles during lipolysis of very low density lipoproteins in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4519-4522.
- PAULOSE, M.M., y CHANG, S.S. (1973). Chemical reactions involved in deep fat frying of foods. VI. Characterization of nonvolatile decomposition products of trilinolein, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 50, 147-154.
- PEACOCK, P.R. y BECK, S. (1951). *Acta Univ. Intern. contra cancer*, 7, 612-618.

- PEERSS, K.E. y SWOBODA, P.A.T. (1979). Octanoate: an assay for oxidative determination in oils and fats. J. Sci. Food Agric., 30, 876-880.
- PEERSS, K. E. y SWOBODA, P.A.T. (1982). Deterioration of sunflower seed oil under simulated frying conditions and during small scale frying of potato chips, J. Sci. Food Agric., 33, 389-395.
- PELECH, S.L.; PRITCHARD, P.H.; BRINDLEY, P.N. y VANCE, D.E. (1983). Fatty acids reverse the cyclic AMP inhibition of triacylglycerol and phosphatidylcholine synthesis in rat hepatocytes. Biochem. J., 216, 129-132.
- PEREZ-CAMINO, M.C. (1986). Alteración termoxidativa en aceites y grasas comestibles: Formación de nuevos compuestos y métodos para su evaluación. Tesis Doctoral, Sevilla.
- PEREZ-CAMINO, M.C.; MARQUEZ RUIZ, G. y DOBARGANES, M. C. (1987). Alteración de grasas usadas en fritura. I. Comportamiento de aceites de oliva y girasol en freidoras domésticas. Grasas y Aceites, 38, 307-312.
- PEREZ-CAMINO, M.C.; GUINDO, A.; MARQUEZ-RUIZ, G. y DOBARGANES, M.C. (1988a). Alteración de las grasas usadas en fritura. II. Variables que influyen en el proceso continuo y análisis real en freidoras industriales. Grasas y Aceites, 39, 39-43.
- PEREZ-CAMINO, M.C.; MARQUEZ-RUIZ, G.; SALGADO, C. y DOBARGANES, M.C. (1988b). Alteración de grasas usadas en frituras. III. Correlación entre índices analíticos y métodos de evaluación directa de compuestos de degradación. Grasas y Aceites, 39, 72-76.
- PEREZ-GRANADOS, A.M. (1990). Consumo de dietas con aceite de oliva crudo o procedente de fritura y utilización nutritiva del hierro en ratas adultas y gestantes. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
- PERKINS, E.G. y KUMMEROW, F.A. (1959). The nutritional effect of polymers isolated from thermally oxidized corn oil. J. Nutr., 68, 101-104.
- PERKINS, E.G. y AKKEREN, V.L.A. (1965). Heated fats. IV. Chemical changes in fats subjected to deep fat frying processes: Cottonseed oil. J. Am. Oil Chem. Soc., 42, 782-786.

- PERKINS, E.G. y IWAOKA, W.T. (1973). Purification of cyclic fatty acid esters: a GC-MS study. J. Am. Oil. Chem. Soc., 50, 44-49.
- PERKINS, E.G. y PINTER, S. (1988). Studies on the concentration on oxidized components of abused fats and the application on HPLC to their separation. J. Am. Oil Chem. Soc., 65, 783-787.
- PERMAYER, J.J. y BOATELLA, J. (1977). Aceites calentados: Modificaciones físico-químicas de interés Bromatológico. Estudio Preliminar. Anal. Bromatol., XXIV, 489-496.
- PERMAYER, J.J.; BOATELLA, J. y DE LA TORRE, M.C. (1985). Modificaciones químicas de los aceites calentados. Grasas y Aceites, 36, 217-222.
- PERRIN, J.L.; PERFETTI, C.; DIMITRIADES, C. y NAUDET, M. (1985). Etude analytique approfondie d'huiles chauffées. I. Techniques analytiques et essais préliminaires. Rev. Franc. Corps Gras., 32, 151-158.
- PLESSIS, C.M. y NIEKERK, P.J. (1981). Evaluation of peanut and cottonseed oils for deep frying. J. Am. Oil Chem. Soc., 58, 575-578.
- POKORNY, J. (1980). Effect of substrates on changes of fats and oils during frying. Riv. Ital. Sostanze. Grasse., 57, 222-225.
- POLING, C.E; EAGLE, E. y RICE, E.E. (1970). Long term responses of rats to heat-treated dietary longevity and histopatology. Lipids, 5, 128-136.
- POTTEAU, B.; LHUISSIER, M.; LECLERC, J.; CUSTOT, F. MEZONNET, R. y CLUZAN, R. (1970). Recherches sur la composition et les effects physiologiques de l'huile de soja chauffée et de differents frantions obtenues á partir de cette huile, Rev. Franc. Corps gras., 17, 143-153.
- POTTEAU, B.; GRANDGIRARD, A.; LHUISSIER, M. y CAUSERET, J. (1977). Recherches recentes sur les effets physiopathologiques d'huiles végetables chauffées, Bibliotheca Nutr. Dieta., 25, 122-133.
- POTTEAU, B.; LHUISSIER, M.; LE CLERC, J.; CUSTOT, F. y MEZONNET, B. (1978). Recherches sur la composition et les effets physiologiques de l'huile de soja chauffée et de diferentes fractions obtennes á partir de cette huile, Rev. Franc. Corps Gras., 17, 234-245.

- PRESIDENCIA DE GOBIERNO (1983). Real Decreto 308/1983 de 25 de Enero, B.O.E., número 44 de 21 de Febrero de 1.983.
- PRIVETT, O.S. (1959). Autoxidation on autoxidative polymerization. J. Am. Oil Chem. Soc., 36, 507-512.
- QUARFORDT, S.H. (1977). The turnover of human plasma very low density lipoprotein. Biophys. Acta, 489, 477-485.
- QUAZI, S.; YOKOGOSHI, H. y YOSHIDA, A. (1983). Effect of dietary fiber on hypercholesterolemia induced by dietary PCB or cholesterol in rats. J. Nutr., 133, 1109-1118.
- RAFALSKI, H.; JABLONSKY, M.T; LE CLERC, A.M y MOREL, L. (1965). La valeur nutritionnelle de l'huile de pepins de raisin, influence de la friture effects physiologiques. Rev. Franc Corps. Gras., 12, 517-523.
- RAFALSKI, H.; JABLONSKY, E. y SWITONIAK, T. (1978). Protein utilization in rats receiving a low-protein diet with varions limiting aminoacids. Brit. J. Nutr., 39, 13-18.
- RAJARAM, D.V.; WHITE, G.H. y BARTER, P.J. (1980). Partial purification and characterization of a triacylglycerol-transfer protein from rabbit serum. Biochem. Biophys. Acta, 617, 383-387.
- RAMEL, P.; LANTEAUME, M.T.; LE CLERC, A.M.; RENNAUD, J. y MOREL, L. (1965). La valeur nutritionnelle de l'huile de pepins de raisin, influence de la friture, effets physiologiques, Rev. Franc. Corps Gras, 12, 517-523.
- RIFICI, V.A. y EDER, H.A. (1984). A hepatocyte receptor for high-density lipoproteins specific for apoprotein AI. J. Biol. Chem., 259, 13814-13818.
- RIFKIND, B.M. (1983). Nutrient high-density lipoprotein relationship: an overview. Prog. Biochem. Pharmacol., 19, 89-109.
- ROBERTSON, C.J. (1967). The practice of deep fat frying. Food Technol., 21, 34-36.

- RODRIGO, J.; ROBLES CHILLIDA, E.M.; MAYO, I. y CERVANTES, C. (1982). Estudio anatomopatológico del efecto producido por la administración de aceites relacionados con el síndrome tóxico a ratas Wistar, alimentadas con una dieta semisintética y deficiente en vitamina E. Programa del C.S.I.C para el estudio del síndrome tóxico, 2, 313-323.

- RODRIGO, J.; ROBLES CHILLIDA, E.M.; ALIA, M.; MAYO, I.; CERVANTES, C.; FERNANDEZ, M.L.; NUÑEZ, E. y MARTINEZ, M.J. (1983). Estudio histopatológico comparativo del efecto que sobre ratas Wistar y durante los periodos de gestación y desarrollo, producen los aceites y anilidas de los ácidos grasos asociados al síndrome tóxico. Jornadas del programa sobre el síndrome tóxico del C.S.I.C.

- RODRIGUEZ, A. (1981). Estudio comparativo de las alteraciones en la lipidemia y lipoproteinemia en ratas por la ingestión de grasas crudas o procedentes de fritura. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.

- RODRIGUEZ, A.; CUESTA, C.; SANCHEZ-MUNIZ, F.J., y VARELA, G. (1984). Estudio de las alteraciones en grasas producidas por frituras e incidencia de su administración sobre el peso e ingesta. Grasas y Aceites, 35, 22-28.

- ROFFO, A.H. (1944). The carcinogenic action of oxidized vegetable oils. Biol. Inst. Med. Exp., 21, 1-10.

- ROHEIM, P.S.; SWITZER, S.; GIRARD, A. y col. (1965). The mechanism of inhibition of lipoprotein synthesis by orotic acid. Biochem. Biophys. Res. Commun, 20, 416.

- ROJO, J.A. y PERKINS, E.G. (1987). Cyclic fatty acid monomer formation in frying fats. I. Determination and structural study. J. Am. Oil Chem. Soc., 64, 414-421.

- ROSS, A.C. y ZILVERSMIT, D.B. (1977). Chylomicron remnant cholesteryl esters as the major constituent of very low density lipoproteins in plasma of cholesterol-fed rabbits. J. Lipid. Res., 18, 169-181.

- ROYCROFT, J.H.; GUNTER, W.B y MENZEL, D.B. (1977). Toxicol. letter, 1, 75-82.

- RUBINSTEIN, A.; GIBSON, J.C.; PATERNITI, J.R.; KAKIS, G.; LITTLE, A.; GINSBERG, H.M. y BROWN, W.V. (1985). Effect of heparin-induced lipolysis on the distribution of apolipoprotein E among lipoprotein subclasses. J. Clin. Invest., 75, 710-721.
- SAKATA, M.; TAKAHASHI, Y. y SONEHARA, M. (1985). Quality of fried foods with palm oil. J. Am. Oil Chem. Soc., 62, 449-454.
- SANCHEZ-MUNIZ, F.J. (1987). Prevención con dieta para una vida longeva. Relevancia del consumo de pescado. Rev. Clin. Esp., 180, 42-47.
- SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; CUESTA, C.; RODRIGUEZ, A.; TERPSTRA, A.H.M y HERRERO, R. (1982). Visualización y separación rápida de las lipoproteínas séricas de la rata por ultracentrifugación en gradientes salinos de densidad. Rev. esp. Fisiol. 38, 281-284.
- SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; CUESTA, C.; RODRIGUEZ, A. y VARELA, G. (1986). Influencia de la ingesta de una grasa tratada térmicamente sobre la lipemia y lipoproteinemia de ratas. Rev. esp. Fisiol., 42, 105-110.
- SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; HERNANDEZ, I. y CUESTA, C. (1989). Estudio de la calidad del aceite extraído de patatas fritas en aceite de oliva. Grasas y Aceites, 40, 399-405.
- SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; MEDINA, R., HIGON, E. y VIEJO, J. Mª. (1990a). Aceites de oliva y girasol y manteca de cerdo en frituras repetidas de sardinas. Valoración de rendimiento y grado de alteración. Grasas y Aceites, 41, 256-262.
- SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; CUESTA, C y CASTRO A. (1990b). Prevalencia y concurrencia de algunos factores de riesgo coronario en una muestra de adolescentes de un Instituto de la Comunidad de Madrid. Rev. Clin. Esp., 186, 119-123.
- SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; HIGON, E; CAVA, F. y VIEJO, J.M. (1991a). Acceptability of diets containing olive oil fried sardines (*sardina pilchardus*) in the prevention of dietary hypercholesterolemia in rats. J. Sci. Food. Agric., 56, 155-165.

- **SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; GARRIDO POLONIO, M.C.; CUESTA, C.** (1991b). Column and high performance size exclusion chromatographies on the evaluation of termoxidative and hydrolytic degradations in sunflower oil used in deep-frying of potatoes, J. Agric. Food Chem. (enviado para su publicación en Diciembre 1991).

- **SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; CUESTA, C.; GARRIDO-POLONIO, M.C. y ARROYO, R.** (1992a). Smale scale frying potatoes in sunflower oil: Quality of the fat content evaluated by different chromatographic methods. J. Agric Food Chem. (en prensa).

- **SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; CUESTA, C.; LOPEZ-VARELA, S.; GARRIDO-POLONIO, M.C. y ARROYO, R.** (1992b). Evaluation of the thermal oxidation rate sunflower oil using various frying treatments. Aocs world Conference and Exhibition on oilseed Technology and utilization. Budapest. Agosto 1992.

- **SANDERS, T.A.B.** (1991). Influence of n-3 fatty acids on blood lipids. World Rev. Nutr. Diet., 66, 358-366.

- **SANELLI, B.** (1979). Variazioni di alcune caratteristiche chimiche e chimico-fisiche nell'olio extra vergine di oliva col riscaldamento. Riv. Ital. Sostanze grasse, 56, 229-234.

- **SAN FELIU GILABERT, P.** (1984). Estudio comparativo de la Digestibilidad de las grasas culinarias procedentes de frituras repetidas. Tesina de Licenciatura. Universidad Complutense. Madrid.

- **SASAGURI, Y.; NAKASHIMA, T.; MORIMATSU, M. y YAGI, K.** (1984). Injury to cultured endothelial cells from human umbilical cord vein by linoleic acid hydroperoxides. J. Appl. Biochem., 6, 144-150.

- **SASAGURI, Y.; MORIMATSU, M.; KINOSHITA, T.; NAKASHIMA, T.; INAGAKI, T. y YAGI, K.** (1985). Difference in susceptibility to injury by linoleic acid hydroperoxides between endothelial and smooth muscle cells of arteries. J. Appl. Biochem., 7, 70-78.

- **SCHAAFSMA, G.; VAN OUDHEVSDEN, A.P.M.** (1974). Discontinue polyacrylamida-gel-elektroforese van serum Lipoprotein. Pharmaceutisch Weekblad, 109, 713-717.

- **SCHACHTER, D.** (1984). Fluidity and function of hepatocyte plasma membranes. Hepatology, 4, 140-151.

- SCHEIBERLE, P. y GROSH, W. (1981). Model experiments about the formation of volatile carbonyl compounds. J. Am. Oil. Chem. Soc., 58, 602-603.
- SCHMITZ, G.; NIEMANN, R.; BRENHAUSEN, B.; KRAUSE, R. y ASSMAN, G. (1985). Regulation of high density lipoprotein receptors uncultured macrophages, role of acyl CoA: cholesterol acyltransferase. EMBO J., 11, 2773-2779.
- SCHONFELD, G. y WITZTUM, J.L. (1978). Nutrition and drug interrelations. Academic. Press. London.
- SCHWANDT, P.; JANETSCHKE, P. y WEISWEILER, P. (1982). High density lipoproteins unaffected by dietary fat modification. Atherosclerosis, 44, 9-17.
- SEBEDIO, J.L.; BONPUNT, A.; GRANDGIRARD, A. y PERVOST, J. (1990). Deep fat frying of frozen prefried french fries: Influence of the amount of linolenic acid in the frying medium. J. Agric. Food. Chem., 38, 1862-1867.
- SELKE, E. y ROHWEDDER, W. K. (1983). Volatile components from trilinolenin heated in air, J. Am. Oil Chem. Soc., 60, 1853-1858.
- SEN GUPTA, VON A. K. (1976). Mizellbildung von Phosphatiden als Grundlage für chromatographische Trennungen. Fette Seifen Anstrichmittel, 78, 111-118.
- SERVANI, A.; MUAKKASSAH-KELLY, S.F. y MONTESTRUQUE, S. (1983). The influence of phospholipase A2 and glutathione peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxides. Arch. Biochem. Biophys., 223, 441-452.
- SERVANI, A.; PETERSON, A.R. (1984). Cholesterol epoxide is a direct-acting mutagen. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 81, 4198-4202.
- SERVANI, A. y HOCHSTEIN, P. (1985). Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. Ann. Rev. Nutr., 5, 365-390.
- SHEFER, S.; HAUSER, S.; BEKERSKY, I. y col. (1969). Feedback regulation of bile acid biosynthesis in the rat. J. Lipid. Res., 10, 646-650.
- SHEFER, S.; HAUSER, S.; BEKERSKY, I. y col. (1970). Biochemical site of regulation of bile acid biosynthesis in the rat. J. Lipid. Res., 11, 404-408.

- SHELburnE, F.; HANKS, J.; MEYERS, W. y QUARFORDT, S. (1980). Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat. J. Clin. Invest., 65, 652-658.

- SHEPHERD, J.; PACKARD, C.J.; PATSCH, J.R.; GOTTO, A.M.Jr. y TAUTON, O.D. (1978). Effects of dietary polyunsaturated and saturated fat on plasma lipids and lipoproteins in man. Am. J. Clin. Nutr., 39, 589-597.

- SHEPHERD, J.; PACKARD, C.J.; GRUNDY, S.M.; YESHURUM, D.; GOTTO, A.M. Jr. y TAUNTON, O.D. (1980). Effects of saturated and polyunsaturated fat diets on the chemicals composition and metabolism of low density lipoproteins in man. J. Lipid. Res., 21, 91-99.

- SHERRIL, B.C. y DIETSCHY, J.M. (1977). Characterization of the sinusoidal transport process responsible for uptake of chylomicrons by the liver. J. Biol. Chem., 253, 1859-1867.

- SHIRAI, K.; BARNHORT, R.L. y JACKSON, R.L. (1981). Hydrolysis of human plasma high density lipoprotein phospholipids and triglycerides by hepatic lipase. Biochem. Biophys. Res. Commun, 100, 591-597.

- SIMKO, V.; BUCKO, A.; BABALA, J. y ONDRECKA, R. (1964). Chemical and physical changes included in food fats during the process of heating and their effects on the histological picture of guinea-pigs organs. Nutr. Dieta, 6, 91-99.

- SIMOPOULOS, A.P.; KIFER, R.R. y WYKES, A.A. (1991). N-3 fatty acids: research advances and support in the field since june 1985. (Worldwide). World Rev. Nutr. Diet., 66, 51-71.

- SIMS, R.J.; FIORITI, J.A. y KANUK, M.J. (1972). Sterol aditives as polymerization inhibitors, for frying oils. J. Am. Oil Chem. Soc., 49, 298-301.

- SIMS, R.J. y FIORITI, J.A. (1975). High temperature reactions of fats with aminoacids. J. Am. Oil Chem. Soc., 52, 144-147.

- SIRTORI, C.R.; GALLI, G.; LOVATI, M.R.; CARRARA, P.; BOSISIO, E. y KIENLE, M.G. (1984). Effects of dietary proteins on the regulation of liver lipoprotein receptors in rats. J. Nutr., 114, 1493-1500.

- SLATER, H.R.; PACKARD, C.J.; BICKER, S. y SHEPHERD, J. (1980). Effects of cholestyramine on receptor mediated plasma clearance and tissue uptake of human low density lipoproteins in the rabbit. J. Biol. Chem., 225, 10210-10217.
- SMITH, L.J. (1983). The effect of methyl prednisolone on lung injury in mice. J. Lab. Clin. Med., 101, 629-635.
- SMITH, L.C.; POWNALL, H.J. y GOTTO, A.M. (1978). The plasma lipoproteins: structure and metabolism. Ann. Rev. Biochem., 47, 751-777.
- SMITH, L.M.; CLIFFORD, A.J.; HAMBLIN, C.L. y CREVELING, R.K. (1986). Changes in physical and chemical properties of shortenings used for commercial deep-fat frying. J. Am. Oil Chem. Soc., 63, 1017-1023.
- SORCI-THOMAS, M.; WILSON, M.D.; JOHNSON, F.L.; WILLIAMS, D.L. y RUDEL, L.L. (1989). Studies on the expresion of genes encoding apolipoproteins B-100 and B-48 and the low density lipoprotein receptor in nonhuman primates. J. Biol. Chem., 264, 9039-9045.
- SOTIRHOS, N.; MO, C.T.; CHANG, S.S. (1986). HPLC Analysis of oxidative and polymerized decomposition products in commercial vegetable oils and heated fats. Fette Seifen Anstrichmittel, 88, 45-48.
- SOUTAR, A.K.; GARNER, C.W. y BAKER, H.N. (1975). Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine on the activity of lecitincholesterolacyltransferase. Biochemistry, 14, 3057-3064.
- SPADY, D.K. y DIETSCHY, J.M. (1985). Dietary saturated triacylglycerols supress hepatic low density lipoprotein receptor activity in the hamster. Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 82, 4526-4530.
- SPADY, D.K. y DIETSCHY, J.M. (1987). Effects of different dietary fatty acids on LDL metabolism in the hamster. En: Abstracts of second colloquium on monounsaturated, natural heart, lung and blood Institute, Bethesda, M.D., USA.
- SPADY, D.K. y DIETSCHY, J.M. (1989). Interaction of aging and dietary fat in the regulation of low density lipoprotein transport in the hamster. J. Lipid. Res., 30, 559-569.

- SPECTOR, A.A.; MATHUR, S.H. y KADUCE, T.L. (1979). Role of acylcoenzyme A: cholesterolacyltransferase in cholesterol metabolism. *Progr. Lipid. Res.*, 18, 31.
- SPECTOR, A.A.; KADUCE, T.L. y DANE, R.W. (1980). Effect of dietary fat saturation on acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase activity of rat liver microsomes. *J. Lipid. Res.* 21, 169-179.
- SPRITZ, N. y MISHKEL, M.A. (1969). Effects of dietary fats on plasma lipids and lipoproteins: an hypothesis for the lipid lowering effect of unsaturated fatty acids. *J. Clin. Invest.*, 48, 78-86.
- STEIN, Y.; DABACH, Y.; HOLLANDER, G.; HALPERIN, G. y STEIN, O. (1983). Metabolism of HDL-cholesterol ester in the rat, studied with a nonhydrolyzable analog, cholesteryl linoleyl ester. *Biochim. Biophys. Acta*, 752, 98-105.
- STEINBERG, D. (1987). Drugs Affecting lipid Metabolism, ed. R. paoletti, D. Kritchevsky and W.L. Holmes, Springer-Verlag, Berlin, pp 42-47.
- STEINBERG, D. (1991). Antioxidants and atherosclerosis. A current assessment. *Circulation*, 84, 1420-1425.
- STEINBERG, D.; PARTHOSORATHY, T.E.; CAREW, J.C.; KHOO, J.C. y WITZTUM, J.L. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, 320, 915-924.
- STEVENSON, S.G.; VAISEY-GENSER, M. y ESKEN, N.A.M. (1984). Quality control in the use of deep frying oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, 1102-1108.
- STIER, R.F. (1989). Nutritional considerations of heated oils. En: "Toxicological concerns-symptomum frying science and practice". Univ. of California, 5 Abril, pp. 10.
- STREZA, D.; KALLAI, M.A. y STEINER, G. (1977). The metabolic heterogeneity of human very low density lipoprotein triglycerides. *Metabolism*, 26, 1333-1337.
- SWIFT, L.L.; MANOWITZ, N.R.; DEWEY DUNN, G. y LEQUIRE, V.S. (1980). Isolation and characterization of hepatic Golgi lipoproteins from hypercholesterolemic rats. *J. Clin. Invest.*, 66, 415-425.

- TABAS, J. y TALL, A.R. (1984). Mechanism of the association of HDL3 with endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts. J. Biol. Chem., 259, 13897-13905.
- TAJIMA, K.; YAMAMOTO, K. y MIZUTANI, T. (1981). Biotransformation of butylated hydroxytoluene (BHT) to BHT-quinone methide in rats. Chem. Pharm. Bull., Tokyo, 29, 3738-3745.
- TAJIMA, K.; YAMAMOTO, K. y MIZUTANI, T. (1983). Identification and determination of glutathione conjugate formed from butylated hydroxytoluene in rats. Chem. Pharm. Bull., Tokyo, 3671-3675.
- TAJIMA, K.; YAMAMOTO, K. y MIZUTANI, T. (1985). Formation of a glutathione conjugate from butylated hydroxytoluene (BHT) in male rats. Toxic. Appl. Pharmac., 43, 399-407.
- TAKAHASHI, O. y HIRAGA, K. (1979). 2,6-di-ter-butyl-4-methylene-2-5 cyclohexadienone: A hepatic metabolite of butylated hydroxytoluene in rats. Fd. Cosmet. Toxicol., 17, 451-459.
- TALL, A.R.; GREEN, P.H.R.; GLICKMAN, R.M. y RILEY, J.W. (1977). Metabolic fate of chylomicron phospholipids and apoproteins in the rat. J. Clin. Invest., 64, 977-983.
- TERPSTRA, A.H.M.; WOODWARD, C. y SANCHEZ-MUNIZ, F.J. (1981). Improved techniques for the separation of serum lipoproteins by density gradient ultracentrifugation: visualization by prestaining and rapid separation of serum lipoproteins from small volumes of serum. Anal. Biochem., 111, 149-157.
- THALER, H. y KLEINAW, H.J. (1969a). Über die autoxydation gesättigter fettsäuren. V. Angriff der Sauerstoffes und bildung von peroxiden bei der oxydation von laurin und stearinsäure sowie ihrer methylester. Fette Seifen Anstrichmittel, 71, 92-92.
- THALER, H. y KLEINAW, H.J. (1969b). Über die autoxydation gesättigter fettsäuren. VI. Isolierung und identifizierung von oxidationsprodukten der laurin-myristin-und stearin-säure sowie ihrer methylester. Fette Seifen Anstrichmittel, 71, 261-264.

- THOMPSON, L.U. y AUST, R. (1983). Lipid changes in french fries and heated oils during commercial deep frying and their nutritional and toxicological implications. Can. Inst. Food. Sci. Technol. J., 16, 246-253.
- THOMPSON, D.C.; CHA, Y.N. y TRUSH, M.A. (1986). The peroxidative activation of butylated hydroxytoluene to BHT-quinone methide and metilbenzoquinone. En: "Biologic Reactive Intermediates, III". J.J. Kocsis, D.J. Jollow, C.M. Witmer, J.D. Nelson y R. Snyder. Plenum Press, New York, pp. 301-315.
- TOMASSI, G. (1983). Effetti indotti dalla cottura sulle sostanze grase alimentari e modificazione del loro valore nutritivo. 5. Symposium on il mollo delle sostanze grase vella alimentazione humana. Regione Toscana C.R.O.E.V.O.T., Firenze, pp. 45-48.
- TURNER, S.R.; CAMPBELL, J.A.; LYNN, W.S. (1975). Polymorphonuclear leukocyte chemotaxis toward oxidized lipid components of cell membranes, J. Exp. Med., 141, 1437-1441.
- VAN TOL, A. (1989). Reverse cholesterol transport. En. "Cholesterol transport systems and their relation to atherosclerosis", J. Steinmetz,; H. Kaffarnik.; y J. Schneider. ed. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg. pp. 85-88.
- VARELA, G. (1977). Les graisses chauffées. Contribution a l'etude du processus de la friture des aliments. Nutr. Dieta., 25, 112-121.
- VARELA, G. (1980). Nutritional aspects of olive oil in the frying process. Proceedings of the IIIrd International Congress on the Biological Value of Olive Oil, September, 8-12, Chania, Crete, pp. 385-402.
- VARELA, G. (1984). A comparison of nutritional changes taking place during manufacture and storage of foods compared with changes taking place in domestic preparation and catering. En: "Thermal processing and Quality of foods". ed. P. Zeuthen.; Elsevier Applied science, London, pp. 864-868.
- VARELA, G. (1988). Current facts about the frying of food. En: "Frying of Food. Principles, Changes, New Approaches". eds. G. Varela, A.E. Bender y I.D. Morton. Ellis Horwood, Chichester, England, pp. 9-25.

- VARELA, G.; MONTEOLIVA, M.; THOMAS, J.; MOREIRAS-VARELA, O.; TRUYOLS, M.; SANCHEZ, F.; IBAÑEZ, C.; FAJARDO, M. y PEREZ, J.D. (1967). Physical, Chemical and Nutritive Changes in Fats and Foods due to frying. Investigation sponsored by the United States Department of Agriculture (Grant UR-E25-(40)-29). Laboratorio de Fisiología Animal, Bioquímica y Fisicoquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, España.
- VARELA, G. y MURILLO, A. (1975). Repercusiones del aceite de oliva y otras grasas alimentarias sobre el proceso que determina su utilización digestiva. Libro II. Congreso Internacional sobre el valor Biológico del Aceite de oliva. Torremolinos (Málaga).
- VARELA, G.; MOREIRAS-VARELA, O. y RUIZ-ROSO, B. (1983). Utilización de algunos aceites en frituras repetidas. Cambios en las grasas y análisis sensoriales de los alimentos. Grasas y Aceites, 34, 101-107.
- VARELA, G. y SANCHEZ-MUNIZ, F.J. (1986). Aceite de oliva y alimentos grasos: rendimiento y modificaciones por frituras repetidas. Memoria presentada al Consejo Oleícola Internacional. Madrid.
- VARELA, G.; BENDER, A.E. y MORTON, I.D. (eds.) (1988). Frying of Food. Principles, Changes, New Approaches. Ellis Horwood, Chichester, England, pp. 1-202.
- VEGA, G.L.; GROSZEK, E.; WOLF, R. y GRUNDY, S.M. (1982). Influence of polyunsaturated fats on composition of plasma lipoproteins and apoproteins. J. Lipid. Res., 23, 811-822.
- VESSBY, B.; BOBERG, J.; GUSTAFSSON, I.B.; KARLSTROM, B.; LITHELL, H. y col. (1980)). Reduction of high density lipoprotein cholesterol apolipoprotein A-I concentrations by a lipid-lowering diet. Atherosclerosis, 35, 21-27.
- VESSBY, B.; LITHELL, H. y BOBERG, J. (1982). Reduction of low density and high density lipoprotein cholesterol by fat modified diets. Hum. Nutr. Clin. Nutr., 36c, 203-211.
- VIEJO, J.M. (1992). Utilización de sardinas fritas en aceite de oliva en el tratamiento de hipercolesterolemia experimental inducida por Dieta. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.

- VIGNERON, P.Y.; SPICHT, P. y ANDEGON, M. (1973). Huiles chauffe'es. III E'tudes des modifications chimiques au cours du chauffage. Rev. Franc. Corps Gras., 20, 463-469.
- WALLER, G.R.; BECKEL, R.W. y ADELEYE, B.O. (1983). Synthesis of antioxidative products. En: "The Maillard Reaction in Foods and Nutrition", ed. G.R. Waller y M.S. Feather, ACS Symp. Am. Chem. Soc. Washington, D.C., pp. 125-127.
- WALKING, A.E. (1975). Evaluation of methods for the determination of polymers and oxidation products of heated vegetable oils: collaborative study of the Gas-Liquid chromatographic method for non-elution materials. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 58, 898-901.
- WALKING, A.E. y ZMACHINSKY, H. (1970). Fatty acid methodology for heated oils. J. Am. Oil Chem. Soc., 47, 530-534.
- WALKING, A.E. y WESSELS, H. (1981). Chromatographic separation of polar and nonpolar components of frying fats. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64, 1329-1330.
- WANG, C.S.; MCCONATHY, W.J.; KLOER, H.W. y ALANPOVIC, P. (1985). Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. J. Clin. Invest., 75, 384-390.
- WEISS, J.J. (1970). Food Oils and their uses. Ed. AVI. Westport. U.S.A.
- WHITE, P.J. y WANG, Y.C. (1986). A high performance size-exclusion chromatographic method for evaluating heated oils. J. Am. Oil Chem. Soc., 63, 914-920.
- WISSLER, R.W. y VESSELINOVITCH, D. (1987). Animal models for hyperlipemia induced atherosclerosis. En: "Drugs affecting lipid metabolism", ed. R. Paleotti.; D. Kritcheusky.; W.L. Holmer. Springer-Verlag: Berlin. pp. 111-116.
- WOLFF, J.P. (1968). Manual D'Analyse des Corps Gras. Ed. Asuolay, Paris.
- WONG, S.H.; NESTEL, P.J.; TRIMBLE, R.P.; STORER, G.B.; ILLMAN, R.J. y TOPPING, D.L. (1984). The adaptive effects of dietary fish and sunflower oil on lipid and lipoprotein metabolism in perfused rat liver. Biochim. Biophys. Acta., 792, 103-109.

- YAGI, K.; OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAMASHITA, M. y NAKASHIMA, T. (1981). Lesion of aortic intima caused by intravenous administration of linoleic acid hydroperoxide. J. Appl. Biochem., 3, 58-64.
- YANISHLIEVA, N. (1985). Differences in the kinetic and mechanism of autoxidation of stearic acid and tristearin. Grasas y Aceites, 36, 115-119.
- YAO, Z. y VANCE, D.E. (1988). The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. J. Biol. Chem., 263, 2998-3004.
- YASUDA, M. y FUJITA, T. (1977). Effect of lipid peroxidation of phospholipase A2 activity of rat liver mitochondria, Jpn. J. Pharmacol., 27, 429-435.
- YASHIDA, H. y ALEXANDER, J.C. (1983). Enzymatic hydrolysis of fractionated products from oils thermally oxidized in the laboratory, Lipids, 18, 402-410.
- ZAKIM, D. (1982). Metabolism of glucose and fatty acids by the liver. En: "Hepatology. A textbook of liver disease". ed. D. Zakim y Boyer, W.B. Saunders Company. Philadelphia.
- ZHANG, Y. y HO, C.T. (1989). Volatile compounds formed from thermal interaction of 2,4-decadienal with cysteine and glutathione. J. Agric. Food. Chem., 37, 1016-1022.
- ZEMAN, W. y SIAKOTOS, A.N. (1973). Lysosomes and Lysosomal Storage Diseases, ed. N.G. Hers, F. Van Hoff., New York. pp. 519-551.